

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-502184

(43) 公表日 平成9年(1997)3月4日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
A 6 1 K 39/395	A B C	9284-4C	A 6 1 K 39/395	A B C D
39/00		9284-4C	39/00	H
39/395		9284-4C	39/395	T
49/00		9454-4C	49/00	A
C 1 2 P 21/08		9358-4B	C 1 2 P 21/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 59 頁)				

(21) 出願番号 特願平7-508266  
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)9月2日  
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)3月1日  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 4 / 0 9 8 7 2  
 (87) 国際公開番号 W O 9 5 / 0 6 4 8 0  
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)3月9日  
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 1 1 5 , 9 9 0  
 (32) 優先日 1993年9月2日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 2 3 2 , 9 2 9  
 (32) 優先日 1994年4月25日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 トラスティーズ・オブ・ダートマス・カレッジ  
 アメリカ合衆国03755ニュー・ハンプシャー、ハノーバー (番地の表示なし)  
 (72) 発明者 ノエル, ランドルフ・ジェイ  
 アメリカ合衆国03745ニュー・ハンプシャー、コーニッシュ、ボックス・257、ルーラル・ルート3番  
 (72) 発明者 フォイ, テレサ・エム  
 アメリカ合衆国03784ニュー・ハンプシャー、レバノン、メドウ・ブルック・ビレッジ314番  
 (74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 体液性免疫の持続性抑制方法

(57) 【要約】

胸腺依存性 (T D) 抗原に対する体液性免疫応答の抑制方法が開示されている。該方法は、接触依存性ヘルパーエフェクター機能を媒介する分子であるアンタゴニストとともに T D 抗原を被験者へ投与することを特徴とする。好ましい具体例においては、該アンタゴニストは、g p 3 9 のアンタゴニストである。一次および二次体液性免疫応答を抑制することができ、抑制は持続性である。

【特許請求の範囲】

1. 接触依存性ヘルパーエフェクター機能を媒介するT h細胞上の分子のアンタゴニストとともにTD抗原を被験者に投与することを特徴とするインビボにおけるTD抗原に対する体液性免疫応答の抑制方法。
2. 接触依存性ヘルパーエフェクター機能を媒介するT h細胞上の分子が、g p 3 9である請求項1記載の抑制方法。
3. アンタゴニストが、抗g p 3 9抗体である請求項2記載の抑制方法。
4. g p 3 9アンタゴニストとともにTD抗原を被験者に投与することを特徴とするインビボにおけるTD抗原に対する体液性免疫応答の抑制方法。
5. 体液性免疫応答が一次体液性免疫応答である請求項4記載の抑制方法。
6. 体液性免疫応答が二次体液性免疫応答である請求項4記載の抑制方法。
7. TD抗原がタンパク質である請求項4記載の抑制方法。
8. TD抗原が抗体である請求項4記載の抑制方法。
9. TD抗原が細胞表面抗原である請求項4記載の抑制方法。
10. TD抗原が抗g p 3 9抗体である請求項4記載の抑制方法。
11. 抗g p 3 9抗体がモノクローナル抗体24-31(ATCC受託番号\_\_\_\_)である請求項10記載の抑制方法。
12. 抗g p 3 9抗体がモノクローナル抗体89-76(ATCC受託番号\_\_\_\_)である請求項10記載の抑制方法。
13. 抗g p 3 9抗体がキメラモノクローナル抗体である請求項10記載の抑制方法。
14. 抗g p 3 9抗体がヒト型モノクローナル抗体である請求項10記載の抑制方法。
15. g p 3 9アンタゴニストがg p 3 9リガンドの可溶性体である請求項4記載の抑制方法。
16. g p 3 9リガンドがCD40である請求項15記載の抑制方法。
17. CD40が融合タンパク質である請求項16記載の抑制方法。
18. T I-2抗原に対する体液性免疫応答が抑制されない請求項4記載の抑

制方法。

19. TD抗原およびgp39アンタゴニストに接触させた被験者に投与することを特徴とするインビボにおけるTD抗原に対する抗原特異的IgE応答の抑制方法。

20. gp39アンタゴニストが、抗gp39抗体である請求項19記載の抑制方法。

21. 抗gp39抗体がモノクローナル抗体24-31(ATCC受託番号\_\_\_\_)である請求項20記載の抑制方法。

22. 抗gp39抗体がモノクローナル抗体89-76(ATCC受託番号\_\_\_\_)である請求項20記載の抑制方法。

23. 抗gp39抗体がキメラモノクローナル抗体である請求項20記載の抑制方法。

24. 抗gp39抗体がヒト型モノクローナル抗体である請求項20記載の抑制方法。

25. gp39アンタゴニストがgp39リガンドの可溶性体である請求項19記載の抑制方法。

26. gp39リガンドがCD40である請求項25記載の抑制方法。

27. CD40が融合タンパク質である請求項26記載の抑制方法。

28. gp39アンタゴニストとともに治療用薬剤を被験者に投与することを特徴とするインビボにおける治療用薬剤に対する体液性免疫応答の抑制方法。

29. 治療用薬剤が抗体である請求項28記載の抑制方法。

30. gp39アンタゴニストが、抗gp39抗体である請求項28記載の抑制方法。

31. 抗gp39抗体がモノクローナル抗体24-31(ATCC受託番号\_\_\_\_)である請求項30記載の抑制方法。

32. 抗gp39抗体がモノクローナル抗体89-76(ATCC受託番号\_\_\_\_)である請求項30記載の抑制方法。

33. 抗gp39抗体がキメラモノクローナル抗体である請求項30記載の抑

制方法。

34. 抗gp39抗体がヒト型モノクローナル抗体である請求項30記載の抑制方法。

35. gp39アンタゴニストがgp39リガンドの可溶性体である請求項28記載の抑制方法。

36. gp39リガンドがCD40である請求項35記載の抑制方法。

37. CD40が融合タンパク質である請求項36記載の抑制方法。

38. gp39アンタゴニストをアレルゲンに接触させた被験者に投与することを特徴とするインビボにおけるアレルゲンに対する体液性免疫応答の抑制方法。

39. さらにIL-4インヒビターを被験者に投与することを特徴とする請求項38記載の抑制方法。

40. IL-4インヒビターが抗IL-4抗体である請求項39記載の抑制方法。

41. gp39アンタゴニストとともにTD抗原を被験者に投与することを特徴とするインビボにおけるTD抗原に対する体液性免疫応答の持続性抑制方法。

42. gp39アンタゴニストとともにTD抗原を被験者に投与することを特徴とする、TI-2抗原に対する体液性免疫応答を残したインビボにおけるTD抗原に対する体液性免疫応答の持続性抑制方法。

43. gp39アンタゴニストとともにTD抗原を被験者に投与することを特徴とするインビボにおけるTD抗原によって誘発された活性化Th細胞の機能の免疫抑制方法。

44. 活性化Th細胞を消滅させない請求項43記載の免疫抑制方法。

45. 活性化Th細胞をアネルギー化しない請求項43記載の免疫抑制方法。

46. (a) 被検抗原をgp39アンタゴニストとともに被験者に投与し；

(b) 該抗原に対する体液性免疫応答を測定し；および

(c) 体液性免疫応答が無いことによって抗原がTD抗原であることを決定するか、または体液性免疫応答が有ることによって抗原がTI-2抗原であることを

決定する

ことを特徴とする抗原がT D抗原またはT I - 2 抗原のいずれであるかの決定方法。

【発明の詳細な説明】

体液性免疫の持続性抑制方法

発明の背景

免疫系は、外来性抗原に対する2つのタイプの抗原特異的応答を引き起こす能力がある。細胞性免疫とは、Tリンパ球によって媒介される免疫系のエフェクター機能をいう場合に用いられる語句である。体液性免疫とは、Bリンパ球による抗原特異的抗体の産生をいう場合に用いられる語句である。ほとんどの抗原に対する体液性免疫の展開には、抗体産生Bリンパ球ばかりでなく、ヘルパーT（以後、T<sub>h</sub>という）リンパ球の関与が必要であることが長い間認識されている。ミチソンの「Eur. J. Immunol.」, 1: 18~25 (1971年) ; クラマンおよびチャパーロンの「Transplant Rev.」, 1: 92~119 (1969年) ; カッツらの「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」, 70: 2624~2629 (1973年) ; ラッフらの「Nature」, 226: 1257~1260 (1970年) を参照。特定のシグナルもしくは“ヘルプ”は、胸腺依存性 (thymus-dependent, 以後、TDという) 抗原による刺激に应答してT<sub>h</sub>細胞によって提供される。幾つかのBリンパ球のヘルプは、T<sub>h</sub>細胞によって放出される可溶性分子（たとえばIL-4およびIL-5などのリンホカイン）によって媒介されるが、B細胞の活性化には、B細胞とT<sub>h</sub>細胞間の接触依存性相互作用も必要である。ヒロハタらの「J. Immunol.」, 140: 3736~3744 (1988年) ; パートレットらの「J. Immunol.」, 143: 1745~1754 (1989年) を参照。これは、B細胞の活性化には、B細胞とT<sub>h</sub>細胞上の細胞表面分子間の絶対的相互作用が必要であることを示す。このような相互作用は、活性化されたT細胞の単離形質膜がB細胞の活性化に必要なヘルパー機能を提供し得るという観察によってさらに支持される。ブライアンの「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」, 85: 564~568 (1988年) ; ホッジキンらの「J. Immunol.」, 145: 2025~2034 (1990年) ; ノエルらの「J. Immunol.」, 146: 1118~1124 (1991年) を参照。

細胞表面分子CD40は未成熟および成熟Bリンパ球の表面上で同定されてお

り、抗体と架橋したときにB細胞の増殖を誘導する。バルら、Eur. J. Immunol.、19:1463~1467(1989)；ゴードンら、J. Immunol.、140:1425~1430(1988)；グルーバーら、J. Immunol.、142:4144~4152(1989)。CD40は分子レベルでクローニングされ、特徴付けられている。スタメンコビッチら、EMBO J.、8:1403~1410(1989)。CD40のリガンドであるgp39(CD40リガンドまたはCD40Lとも称する)もまた分子レベルでクローニングされ、特徴付けられている。アーミテージら、Nature、357:80~82(1992)；レーダーマンら、J. Exp. Med.、175:1091~1101(1992)；ホーレンバーフら、EMBO J.、11:4313~4319(1992)。gp39タンパク質は活性化されたCD4<sup>+</sup>Th細胞では発現されるが、休止のCD4<sup>+</sup>Th細胞では発現されない。スプリッグスら、J. Exp. Med.、176:1543~1550(1992)；レインら、Eur. J. Immunol.、22:2573~2578(1992)；ロイら、J. Immunol.、151:1~14(1993)。gp39遺伝子でトランスフェクトされ細胞表面上にgp39タンパク質を発現する細胞はB細胞の増殖を誘導することができ、他の刺激性シグナルとともに抗体の産生を誘導することができる。アーミテージら、Nature、357:80~82(1992)；ホーレンバーフら、EMBO J.、11:4313~4319(1992)。

体液性免疫応答の誘発は重要な宿主防御メカニズムであるが、特定の抗原に対する抗体産生を抑制することが有益である状況も考えられる。たとえば、アレルギーに対する体液性応答の抑制することによって、個体におけるアレルギー反応を予防または軽減することができる。さらに、治療用抗体を投与する場合、該抗体に対する体液性応答を抑制することによって、抗体の治療的効能を持続性にすることができる。

#### 発明の要約

体液性免疫を抑制するためのひとつのアプローチは、B細胞の活性化を阻害することである。本発明は、B細胞を刺激するTh細胞の能力を阻害し、それによ

てB細胞の活性化および抗体の産生を妨害する、インビボにおけるTD抗原に対する体液性免疫応答を阻害する方法に関する。本発明は少なくとも幾分かは、B細胞の活性化のためのTh細胞上のgp39とB細胞上のCD40の間のインビボ相互作用の必要性に基づいている。インビボにおいてgp39とCD40の間の相互作用を阻害するのに有効であるgp39のアнтаゴニストをTD抗原とともに被験者に投与してTD抗原に対する体液性免疫を抑制する。投与されるgp39アンタゴニストはgp39に結合する抗体である。好ましい具体例において、gp39アンタゴニストは、抗ヒトgp39抗体または抗マウスgp39抗体(たとえばMR1)などのモノクローナル抗体である。キメラ抗体、ヒト型抗体および抗体フラグメントもまた本発明の範囲に包含される。本発明の別の態様においては、gp39アンタゴニストは、gp39のリガンドであるCD40の可溶性形態である。CD40の可溶性融合タンパク質もまた本発明に包含される。

本発明方法によって阻害される体液性免疫応答は、抗原に対する最初の接触である場合には一次体液性免疫応答であり、あるいは先に遭遇した抗原に対する再接触である場合には二次体液性免疫応答である。たとえば、本明細書に記載された方法を用い、抗原特異的IgM抗体、IgG抗体、IgD抗体および/またはIgE抗体の産生を阻害することができる。さらに、本発明方法によって、インビボにおいて体液性免疫応答の抑制を持続性に行うことができる。

本発明の別の態様は、TD抗原に対する体液性免疫応答を阻害する法である。本発明において取り扱う抗原は、特異的抗体を産生するためにgp39とB細胞の表面上にあるリガンド(たとえばCD40)との相互作用を必要とする抗原である。通常、TD抗原はタンパク様の抗原である。本発明の好ましい具体例においては、該抗原は、治療用抗体、薬物、アレルゲンまたは外来性細胞である。本発明方法は、胸腺非依存性II型(以後、TI-2という)抗原に対する体液性免疫応答は残しながらも、TD抗原に対する体液性免疫応答を阻害するのに有効である。

本発明のさらに別の態様は、gp39アンタゴニストを投与してgp39とB細胞の表面上にあるリガンド(たとえばCD40)との相互作用を妨害すること



によって、インビボにおいて活性化されたT<sub>h</sub>細胞のヘルパー機能を特異的に阻害する方法である。本発明にしたがって、T<sub>h</sub>細胞の機能を消滅あるいはアネルギー化することなく、インビボにおいて活性化T<sub>h</sub>細胞のヘルパー機能を阻害することができる。

さらに本発明は、g p 3 9 アンタゴニストをその他の免疫抑制剤とを組み合わせ投与することによって、体液性免疫応答をインビボにおいて阻害する方法を提供する。g p 3 9 アンタゴニストとともに投与する他の免疫抑制剤は、サイトカイン疎外剤、CD 2 8 / C T L A 4 T細胞共同刺激経路インヒビターまたは免疫抑制薬物などである。

さらに本発明の別の態様は、抗原がT<sub>D</sub>またはT<sub>I</sub>-2抗原のどちらであるかを決定する方法である。これは、インビボにおける該抗原に対する体液性免疫応答がg p 3 9 アンタゴニストの投与によって阻害されるかどうかによって決定できる。

#### 図面の簡単な説明

図1 Aは、インビボにおける抗g p 3 9 処置による一次抗SRBC I g M抗体産生の抑制を表す棒グラフである。

図1 Bは、インビボにおける短期間の抗g p 3 9 処置後の一次抗SRBC I g M抗体産生の持続性の抑制を表すグラフである。

図2 Aは、インビボにおける抗g p 3 9 処置による二次抗KLH抗体産生（各種イソタイプ）の抑制を表す棒グラフである。抗体力価は抗原投与の7日後に測定した。

図2 Bは、インビボにおける抗g p 3 9 処置による二次抗KLH抗体産生（各種イソタイプ）の抑制を表す棒グラフである。抗体力価は抗原チャレンジの14日後に測定した。

図3は、インビボにおける抗g p 3 9 処置による一次抗Ch i L 6 I g M抗体産生（左）および二次抗Ch i L 6 I g G 1抗体産生（右）の抑制を表す2つの棒グラフである。

図4 Aは、TNP-SRBCでの免疫感作およびインビボにおける抗g p 3 9

処置による一次抗TNP IgM抗体産生の抑制を表す棒グラフである。

図4Bは、TNP-Ficollでの免疫感作およびインビゴにおける抗gp39処置による一次抗TNP IgM抗体産生の抑制を表す棒グラフである。

図5は、非処置マウスに対して養子移入を行う際に、前以てインビゴ抗gp39処置に付したT細胞の無傷のヘルパー活性を表す棒グラフであり、抗gp39投与がTh細胞の機能を消滅させないことを示している

図6Aは、インビゴ投与の7、14および21日後の血清中に存在する抗gp39抗体を表すウエスタンブロットである。

図6Bは、インビゴ投与の7、14および21日後の血清中の残存抗gp39活性のパーセントを表すグラフである。

図7A、7Bおよび7Cは、CD40Ig（パネルA）、mAb4D9-8（パネルB）またはmAb4D9-9（パネルC）のいずれかによる6時間活性化ヒト末梢血リンパ球の染色を示すフローサイトメトリープロファイルである。

図8A、8Bおよび8Cは、mAb4D9-8（パネルA）、mAb4D9-9（パネルB）またはCD40Ig（パネルC）のいずれかで染色し、シクロスポリンAの存在下で培養した6時間活性化ヒト末梢血リンパ球の染色を示すフローサイトメトリープロファイルである。

図9Aおよび9Bは、非標識mAb4D9-8（パネルA）または非標識mAb4D9-9（パネルB）の存在下、CD40Igによる6時間活性化ヒト末梢血リンパ球の染色を示すフローサイトメトリープロファイルである。

図10は、細胞を抗ヒトgp39mAb4D9-8、4D9-9、24-31、24-43、89-76または89-79の存在下で培養した場合の、可溶性gp39およびIL-4によって誘導されたヒトB細胞増殖の抑制を示すグラフである。

図11は、細胞を抗ヒトgp39mAb24-31または89-79の存在下で培養した場合の、アロ特異的混合リンパ球応答の抑制を示すグラフである。

#### 発明の詳細な記載

胸腺依存性（TD）抗原に対する体液性免疫の生成には、抗原に対する特異的

抗体を産生しうるBリンパ球だけでなく、Bリンパ球の活性化に必要なTh細胞からの寄与も要求される。B細胞の活性化のためのTh細胞の必要性は、外来性のサイトカインをB細胞に供しても取り去ることはできない。むしろ、B細胞とTh細胞間の接触依存性で、細胞膜媒介性の相互作用は、体液性応答を誘発するために絶対必要なものである。この相互作用に関与する受容体-リガンドの対、CD40およびgp39が同定されている。CD40はB細胞上に存在し、gp39に結合する能力を持っており、gp39は活性化したTh細胞上に誘発されてB細胞を刺激し、最終的に特異的抗体が産生される。CD40-gp39相互作用を分断することが、特異的体液性免疫応答の生成を妨害する手段として提供される。

このように、本発明は、インビボにおいてTD抗原に対する体液性免疫応答を阻害する方法を提供する。体液性免疫応答は、接触依存性ヘルパーエフェクター機能を媒介するTh細胞上の分子とBリンパ球の表面上のそのリガンドとの相互作用を妨害することによって阻害される。好ましい具体例においては、インビボにて被験者にgp39アンタゴニストを投与しながらB細胞をTD抗原に接触させてT細胞上のgp39とB細胞上のCD40との相互作用を妨害することによって体液性免疫応答を阻害する。ひとつの具体例においては、インビボにてgp39アンタゴニストとともにTD抗原を投与することによってB細胞をTD抗原に接触させる。好ましくは、このTD抗原は治療剤（治療用抗体または薬物など）であり、この抗原を治療処置のために患者に投与し、これに対する体液性免疫応答を阻害することによって、該薬剤の治療上の効能を持続性に行うことができる。他の具体例においては、該TD抗原は、被験者が環境的に接触する抗原（たとえばアレルゲンなど）であり、この場合、体液性免疫応答は被験者にとって有害である（アレルギー反応が引き起こされるなど）。この状況においては、体液性免疫応答を抑制することは、被験者にとって治療的に有益なことである。

#### I. gp39アンタゴニスト:

本発明の方法によれば、gp39アンタゴニストを被験者に投与して、T細胞上のgp39とB細胞上のgp39リガンドとの相互作用を妨害する。gp39

アンタゴニストとは、この相互作用を妨害する分子として定義される。gp39アンタゴニストは、gp39に対して向けられた抗体（たとえば、gp39に対するモノクローナル抗体）、gp39に対して向けられた抗体のフラグメントまたは誘導体（たとえば、FabまたはFab'）2フラグメント、キメラ抗体またはヒト型抗体）、可溶性形態のgp39リガンド（たとえば、可溶性CD40）、可溶性形態のgp39リガンドの融合タンパク質（たとえば、可溶性CD40lg）、またはgp39-CD40相互作用を破壊または妨害する薬剤であってよい。

#### A. 抗体

哺乳動物（たとえば、マウス、ハムスター、またはウサギ）は、該哺乳動物において抗体応答を引き起こす免疫原の形態のgp39タンパク質またはタンパク質断片（たとえば、ペプチド断片）で免疫することができる。その表面にgp39を発現する細胞もまた免疫原として用いることができる。他の免疫原としては、精製したgp39タンパク質またはタンパク質断片が挙げられる。gp39の精製は、標準精製法によりgp39発現細胞から行うことができる。gp39cDNA（アーミテージら、Nature、357:80~82（1992）；レーダーマンら、J. Exp. Med.、175:1091~1101（1992）；ホーレンバーフら、EMBO J.、11:4313~4319（1992））を宿主細胞、たとえば細菌または哺乳動物細胞株中で発現させ、gp39タンパク質を精製することができる。gp39ペプチドは、gp39のアミノ酸配列（アーミテージら、Nature、357:80~82（1992）；レーダーマンら、J. Exp. Med.、175:1091~1101（1992）；ホーレンバーフら、EMBO J.、11:4313~4319（1992））に開示）に基づき、合成することができる。タンパク質に免疫原性を付与する技術としては、担体への結合、または当該技術分野でよく知られた他の方法が挙げられる。たとえば、タンパク質をアジュバントの存在下で投与することができる。免疫の進行は、血漿または血清中の抗体力価の検出によりモニターすることができる。抗体レベルを評価するため、抗原として免疫原を用いた標準ELISAまたは他のイムノアッセイを用い

ることができる。

免疫後、抗血清を得ることができ、所望ならポリクローナル抗体を該血清から単離することができる。モノクローナル抗体を産生するには、抗体産生細胞（リンパ球）を免疫動物から回収し、標準細胞融合法によりミエローマ細胞と融合させてこれら細胞を不死化し、ハイブリドーマ細胞を得る。かかる技術は当該技術分野においてよく知られている。たとえば、コーラーおよびミルシュテインにより最初に開発されたハイブリドーマ法（Nature（1975）256：495～497）、並びにヒトB細胞ハイブリドーマ法（コズバー（Kozbar）ら、Immunol. Today（1983）4：72）、ヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ法（コール（Cole）ら、Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy（1985）（アレン・アール・プリス、77～96頁））、および結合（combinatorial）抗体ライブラリーのスクリーニング（ヒューズ（Huse）ら、Science（1989）246：1275）などの他の方法。該タンパク質またはペプチドに特異的に反応する抗体の産生についてハイブリドーマ細胞を免疫化学的にスクリーニングし、モノクローナル抗体を単離することができる。

本明細書において用いる抗体なる語は、gp39タンパク質またはそのペプチドまたはgp39融合タンパク質と特異的に反応するフラグメントをも包含する。抗体は常法によりフラグメントとすることができ、全抗体について記載したのと同様にしてフラグメントを有用性についてスクリーニングすることができる。たとえば、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは抗体をペプシンで処理することにより生成させることができる。得られたF(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、ジスルフィド架橋を還元すべく処理してFab'フラグメントとすることができる。本発明の抗体はさらに、抗gp39部分を有する2特異的分子およびキメラ分子を包含する。

非ヒト被験者において産生された抗体をヒトの治療に用いる場合には、これら抗体は種々の程度で外来のものとして認識され、該患者において免疫応答が生じるかもしれない。この問題を最小限に抑えまたは排除する（一般的な免疫抑制に好ましい）一つの方法は、キメラ抗体誘導体、すなわち非ヒト動物の変換領域と

ヒトの定常領域とを組み合わせた抗体分子を作製することである。キメラ抗体分子としては、たとえば、マウス、ラットまたは他の種からの抗体の抗原結合ドメインをヒト定常領域と組み合わせたものが挙げられる。種々のキメラ抗体の作製法が記載されており、g p 39を認識する免疫グロブリン可変領域を含むキメラ抗体を作製するのに用いることができる。たとえば、モリソン (Morrison) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851 (1985) ; タケダ (Takeda) ら、Nature 314: 452 (1985) 、カビリー (Cabilly) ら、米国特許第4,816,567号 ; ボス (Boss) ら、米国特許第4,816,397号 ; タナグチ (Tanaguchi) ら、ヨーロッパ特許出願公開E P 171496号 ; ヨーロッパ特許出願公開第0173494号、英国特許第GB2177096B号を参照。かかるキメラ抗体は、対応する非キメラ抗体に比べてヒト被験者にける免疫原性が小さいことが期待される。

ヒトの治療目的に用いる場合、可変領域の一部、とりわけ抗原結合ドメインの保存されたフレームワーク領域をヒト由来のものとし、超可変領域のみを非ヒト由来のものとしたヒト定常部キメラを作成することによって、g p 39タンパク質またはペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはキメラ抗体をさらにヒト型することができる。かかる改変免疫グロブリン分子は当該技術分野で知られた幾つかの技術 (たとえば、テングら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80: 7308~7312 (1983) ; コズバーら、Immunology Today、4: 7279 (1983) ; オルソンら、Meth. Enzymol.、92: 3~16 (1982) ) のいずれによっても作製することができ、PCT公開WO92/06193号またはE P 0239400号の教示に従って作成するのが好ましい。ヒト型抗体は、たとえば、スコットジェン・リミテッド、グレートブリテン、ミドルセックス、トゥイッケナム、ホリー・ロード2番によって商業的に製造することができる。

g p 39タンパク質またはペプチドに対して特異的に反応する特異的抗体、または抗体フラグメントの他の作製方法は、細菌中に発現された免疫グロブリン遺伝子またはその一部をコードする発現ライブラリーをg p 39タンパク質または

ペプチドでスクリーニングすることである。たとえば、ファージ発現ライブラリーを用い、完全なF a b フラグメント、VH領域およびF V領域を細菌中で発現させることができる。たとえば、ウォードら、Nature、341:544~546:(1989);ヒューズら、Science、246:1275~1281(1989);およびマクファーティら、Nature、348:552~554(1990)を参照。かかるライブラリーを、たとえばg p 39ペプチドを用いてスクリーニングすることにより、g p 39に反応性の免疫グロブリンフラグメントを同定することができる。別法として、SCID-huマウス(ジェンファームより入手可能)を用いて抗体またはそのフラグメントを作製することができる。

#### B. g p 39の可溶性リガンド

体液性免疫を抑制するために投与しうる他のg p 39アンタゴニストは、可溶性形態のg p 39リガンドである。可溶性CD40などのg p 39の1価可溶性リガンドはg p 39に結合することができ、それによってg p 39とB細胞上のCD40との相互作用を抑制する。「可溶性」なる語は、リガンドが細胞膜に永久的に結合していないことを示す。可溶性g p 39リガンドは、化学合成によって、または好ましくは組換えDNA法によって作製することができる。好ましい可溶性g p 39リガンドは可溶性CD40である。別の態様として、可溶性g p 39リガンドはまた融合タンパク質の形態であってもよい。かかる融合タンパク質は、第二の分子に結合した少なくとも一部のg p 39リガンドを含む。たとえば、CD40は免疫グロブリンとの融合タンパク質(すなわち、CD40 I g 融合タンパク質)として発現させることができる。一つの態様において、C $\gamma$ 1のヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域に対応する配列のアミノ酸残基に結合したCD40分子の細胞外ドメイン部分のアミノ酸残基からなる融合タンパク質を作製してCD40 I g 融合タンパク質を生成する(たとえば、リンズレイら(1991) J. Exp. Med. 1783:721~730;カボンら(1989) Nature 337、525~531;およびカボン米国特許第5,116,964号を参照)。融合タンパク質は、化学合成によって、または好ましくはCD40のcDNAに基づいて組換えDNA法によって作製することができる(スタメンコビツ

チラ、EMBO J.、8:1403~1410(1989))。

#### 1 I. 体液性免疫が抑制される抗原

本発明は、T h細胞によってもたらされる接触依存性ヘルパー機能を必要とする、抗原に対する体液性免疫に関する。胸腺依存性(TD)抗原と称されるクラス抗原が本発明に包含される。T h細胞からの接触依存性“ヘルプ”が必要となるのは、T細胞上のg p 39とB細胞上のCD 40間の相互作用における必要性に由来する。本発明で用いる定義において、語句“TD抗原”とは、抗原に対する体液性免疫応答を誘発するために、T細胞とB細胞の間のg p 39-CD 40相互作用を必要とする抗原を意味する。本発明に包含されるTD抗原の他の形態は、タンパク質に結合したハプテンと称される分子である。この場合、タンパク質は、ハプテンに対する体液性免疫応答を誘発するためにT細胞のヘルプを誘発するための担体として働く。

本発明においては、TD抗原を可溶性形態で被験者に投与することができる(可溶性タンパク質の注射など)。あるいはTD抗原は、細胞表面タンパク質などの細胞の表面上に存在するものであってもよい。該TD抗原を、g p 39アンタゴニストとともに被験者に投与することができ、あるいは被験者をTD抗原に環境的に接触させてもよい(アレルゲンなど)。好ましい具体例において、TD抗原は、治療の目的で被験者に投与された薬剤である。この薬剤はたとえば、治療用抗体またはTD抗原である他の形態の治療剤であってよい。被験者中のたとえば治療用抗体のクリアランスを妨害することによって、該治療用抗体に対する体液性免疫応答をインビボにおいて阻害する効果を持続性に行うことができる。治療剤として働く小さい分子(ハプテンとして機能する)は、B細胞を活性化するT細胞ヘルパー機能を誘発するタンパク質または他の担体とともに投与されるならば、これらの分子もまた体液性免疫応答を抑制する対象となる標的抗原になりうる;これらの治療剤に対する体液性免疫の抑制もまた同様に、その効果を持続性に行うことができる。

本発明は、胸腺非依存性II型(TI-2)抗原に対する応答性に影響を与え、ことなくTD抗原に対する体液性免疫応答を抑制する方法を提供する。TI-



2 抗原には、ポリクローナル手法でB細胞を非特異的に活性化する多糖および脂質が含まれる。本発明で用いる定義において、語句“T I - 2 抗原”とは、抗原に対する体液性免疫応答を誘発するためにT細胞とB細胞の間のg p 3 9 - C D 4 0 相互作用を必要としないすべての抗原を意味する。本発明は、抗原に対する体液性免疫応答がg p 3 9 アンタゴニストによって阻害されるかどうかを測定することによって、抗原が本発明の定義におけるTD抗原であるかT I - 2 抗原であるかを同定する方法を提供する。

### III. 体液性免疫の抑制

本発明は、TD抗原に対する体液性免疫応答を阻害する方法に関する。体液性免疫応答は、TD抗原に対して最初の接触である場合には一次体液性免疫応答であり、あるいは該抗原に対する再接触である場合には二次体液性免疫応答である。1 種または2 種以上のイソタイプ抗体の産生を阻害することができる。一次体液性免疫応答の場合、優先的に産生される抗体はI g Mであり、I g Mの産生が優先的に抑制される。二次体液性免疫応答の場合、I g M、I g GおよびI g Eなどの数種のイソタイプの抗体の産生が抑制される。

本発明は、TD抗原に対する体液性免疫の持続性抑制方法を提供する。ここで用いる“持続性”とは、TD抗原に対する抗体の産生の抑制が、インビボにおけるg p 3 9 アンタゴニストの投与が終了した後も持続することを意味する。

### IV. g p 3 9 アンタゴニストの投与

本発明方法にしたがって、TD抗原に接触させた被験者にg p 3 9 アンタゴニストを投与することにより、TD抗原に対する体液性免疫応答を阻害することができる。ひとつの具体例において、TD抗原とともにg p 3 9 アンタゴニストを投与する。g p 3 9 アンタゴニストはTD抗原と同時に投与されるのが好ましいが、TD抗原がB細胞の活性化を誘発する前にg p 3 9 アンタゴニストが投与される限りは、TD抗原を投与する前またはTD抗原の投与後に投与されてもよい。その他の具体例においては、被験者を環境的に抗原に接触させる。この場合、抗原に接触させた後、B細胞の活性化を予防するに十分なだけすばやく、g p 3 9 アンタゴニストがインビボ投与されるべきである。

本発明のアンタゴニストは、体液性免疫を抑制するため、インビボの医薬投与に適した生物学的に両立しうる形態にて被験者に投与する。「インビボの医薬投与に適した生物学的に両立しうる形態」とは、該タンパク質の治療効果が毒性作用より重視されるように投与されるアンタゴニストの形態をいう。被験者なる語は、免疫応答を引き起こしうる生物、たとえば哺乳動物を包含する。被験者の例としては、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびこれらのトランスジェニック種が挙げられる。gp39とCD40との相互作用を妨害するアンタゴニストの投与は、任意に医薬的に許容しうる担体中にて薬理学的形態で行うことができる。治療学的に活性な量の本発明の治療用組成物の投与とは、所望の結果を達成するのに必要な投与量および時間にて有効な量と定義される。たとえば、gp39とCD40の相互作用を妨害するアンタゴニストの治療学的に活性な量は、個体の疾患状態、年齢、性および体重、および該アンタゴニストが該個体において所望の応答を引き起こす能力に従って変わってよい。投与計画は最適の治療応答をもたらすように調節する。たとえば、幾つかの分割投与量を毎日投与することができるし、または治療状況の緊急性によって示されるように比例して投与量を減らしていくこともできる。

活性化化合物（たとえば、アンタゴニスト）の投与は、注射（皮下、静脈内など）、経口投与、吸入、経皮投与、または直腸投与などの常法により行うことができる。投与経路に応じて、活性化化合物を不活化する酵素、酸または他の天然の条件から該化合物を保護するために該化合物を物質中にコーティングすることができる。

非経口以外の投与によりgp39とCD40の相互作用を妨害するアンタゴニストを投与するには、不活化を防ぐ物質で該アンタゴニストをコーティングするかまたは該物質と該アンタゴニストとを同時に投与する必要がある。たとえば、アンタゴニストは、適当な担体または希釈剤中にて、または酵素阻害剤とともにまたはリポソームなどの適当な担体中にて一緒に投与することができる。薬理的に許容しうる希釈剤としては、食塩および水性緩衝液が挙げられる。酵素阻害剤としては、膵臓トリプシンインヒビター、ジイソプロピルフルオロホスフェー

ト (DEP) およびトラシロール (trasylol) が挙げられる。リボソームとしては、水中油中水懸濁液並びに通常のリボソーム (ストレジヤン (Strejan) ら (1984) J. Neuroimmunol 7: 27) が挙げられる。

活性化化合物はまた、非経口または腹腔内投与することもできる。グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれら混合物中、および油中で分散液を調製することもできる。通常の貯蔵および使用条件では、これら調製物には微生物の増殖を防ぐための保存剤が含まれる。

注射用途に適した医薬組成物としては、滅菌水溶液 (水溶性の場合) または分散液および滅菌注射用溶液または分散液を即座に調製するための滅菌粉末が挙げられる。いずれの場合においても組成物は滅菌されていなければならない、容易な注射器操作が可能な程度に流体でなければならない。該組成物は製造および貯蔵条件下で安定でなければならない、細菌や真菌などの混入微生物の作用から保護されていなければならない。担体は、たとえば、水、エタノール、ポリオール (たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、およびこれらの適当な混合物を含む溶媒であるかまたは分散媒体であってよい。適当な流動性は、たとえば、レンチンなどのコーティングを使用することによって、分散液の場合は必要な粒径を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持することができる。微生物の作用からの保護は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、たとえばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどにより行うことができる。多くの場合、等張剤、たとえば糖、ポリアルコール、たとえばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムなどが組成物に含まれているのが好ましいであろう。注射用組成物の持続吸収は、吸収を遅らせる薬剤、たとえばモノステアリン酸アルミニウムやゼラチンなどを組成物中に配合することにより行うことができる。

滅菌注射用溶液の調製は、必要なら上記成分の1またはその組み合わせとともに所要量の活性化化合物 (たとえば、gp 39 と CD 40 の相互作用を妨害するアントゴニスト) を適当な溶媒中に配合し、ついで滅菌濾過することにより行うことができる。一般に分散液の調製は、基本的な分散媒体と上記から選ばれた必要

な他の成分を含む滅菌ビヒクル中に活性化化合物を配合することにより行う。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合は、好ましい調製法は真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより活性成分（たとえば、アンタゴニスト）と前以て滅菌濾過した溶液からの所望の追加成分との粉末が得られる。

上記のように活性化化合物を適切に保護してある場合は、該タンパク質は、たとえば不活性な希釈剤または同化しうる食用担体とともに経口投与することができる。本明細書において「薬理的に許容しうる担体」とは、溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などのすべてを包含する。薬理的に活性な物質のためにかかる媒体および剤の使用は、当該技術分野でよく知られている。通常の媒体または剤が活性化化合物と両立しない場合以外は、治療学的組成物中に使用することができる。補助的な活性化化合物を該組成物中に配合することもできる。

投与の容易および投与量の均一さのため、単位投与剤型で非経口組成物に調合するのが特に有利である。本明細書において単位投与剤型とは、治療すべき哺乳動物被験者に対する単位投与量として適した物理的に区別される単位をいう。各単位には、所要の薬理的担体と組み合わせて所望の治療効果を奏するように計算された前以て決定された量の活性化化合物が含まれる。本発明の単位投与剤型は、（a）活性化化合物の独特の特性および達成しようとする特定の治療効果、および（b）個体における治療感受性（treatment of sensitivity）のためにかかる活性化化合物を調合する際の内在する技術的制約に直接依存して個々に特定される。

#### V. gp39アンタゴニストと他の免疫抑制剤との併用投与

Th細胞上の協同刺激分子であるCD28の可溶性CTLA-4がトリガーとなる妨害もまたTD抗体反応を抑制し（30）、異種移植片における拒絶反応を遮断する（31）ことが解っている。抗gp39投与と同様に、可溶性CDは、持続性免疫抑制状態を誘発する。抗gp39およびCTLA-4は、体液性免疫応答における別の段階においてそれらの免疫抑制効果を媒介するので、これらの2つの免疫抑制剤の併用投与によって、相加的または相乗的免疫抑制効果が得られる。

アレルギー反応はIgE抗体によって媒介される。IgE応答が産生されるには、サイトカインIL-4が必要である。TD抗原に対するIgE応答の阻害は、gp39アンタゴニストとIL-4の阻害剤（抗IL-4抗体など）とを併用投与することによって、より効果的に行われる。

次に述べる実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれによって限定されるものではない。本明細書に引用されたすべての引例文献および発行された特許出願の内容が、本発明の参考文献である。ランドルフ・ジェイ・ノエルらの名称で同日付で出願された特許出願の内容および“抗原特異的T細胞寛容の誘発方法”と題する文献も本発明の参考文献である。

実施例においては以下の方法を用いた。

#### 材料および方法

実験動物： この実験におけるインビボ実験用に6～8週齢の雌のBalb/cマウス（ジャクソン・ラボラトリーズ，バー・ハーバー，ME）を用いた。実験動物はダートマス・メディカル・スクールにおいて特別な病原体フリーの動物用施設で飼育された。

ヘルパーT細胞クローン（Th1）： ウスターのユニバーシティ・オブ・マサチューセッツから、D1.6、すなわちI-A<sup>d</sup>制限されたウサギIg特異的Th1クローン（21）を入手した。本明細書中では、D1.6をTh1と表記する。

試薬および抗体： MR1、すなわちハムスター抗マウスgp39mAb（16）は、腹水をDEAE HPLCにて精製して得た。対照抗体として用いたハムスターIg（HIg）は、ハムスター血清（アキュレイト・ケミカル・アンド・サイエンティフィック・コーポレーション，ウエストビューティ，NY）から同様にして得た。RG7/7.6.HL、すなわちマウス抗ラットκ鎖（ハムスターκ鎖と強い交差反応性がある）抗体（RG7と表記）（22）をHRPOまたはFITCと結合させ、MR1およびHIgを検出するための第2試薬として用いた。アフィニティー精製ヤギ抗マウスIgM、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub>およびIgG<sub>3</sub>（サザン・バイオテクノロジー，バーミンガム，AL）を抗原特異的ELISAおよびIgMおよびIgG<sub>1</sub>合同ELISAにおいて検出抗体として用

いた。B1E3、すなわちモノクローナル抗マウスIgE（ユニバーシティ・オブ・アイオワのT. ウォルドシュミット博士から提供を受けた）をIgE抗KLH ELISAにおける検出抗体として用いた。キメラ-L6（Chi-L6と表記）、すなわち腫瘍抗原L6に対して特異的なヒト型IgG<sub>1</sub>（23）は、プリストリーマイヤーズ・スクイブ・ファーマシューティカル・リサーチ・インスティテュート、シアトル、WAから提供を受けた。抗CD4、すなわちGK1.5（24）は、腹水のHPLC精製によって調製した。ヒツジ赤血球細胞（SRBC）は、コロラド・セイラム・コーポレイション（デンバー、CO）から購入した。抗SRBCブラークアッセイ用のシー・ブラーク（Sea Plaque）寒天は、FMC・コーポレイション（ロックランド、MA）から入手した。乳児ウサギ補体は、セダーレイン（ホーンビー、オンタリオ、カナダ）から購入した。KLH、すなわちキーホールリンベットヘモシアニン（*Megathura crenulata*由来）は、カルビオケム（ラジョラ、CA）から購入した。免疫感作用の完全フロイントアジュバント（CFA）は、シグマ・ケミカル・コーポレイション（セントルイス、MO）から入手した。TNP-SRBC、TNP-KLHおよびTNP-BSAは、文献（25）の記載に従って調製した。

インビボ一次および二次抗体反応の産生のための免疫感作：

一次免疫応答： SRBCまたはTNP-SRBCに対する一次抗体反応を引き起こすために、マウスを200  $\mu$ lの1% SRBCまたはTNP-SRBC懸濁液（静脈注射）で免疫感作した。ジャーンのブラークアッセイ（26）に変更を加え、抗原投与後第5日にIgMの抗SRBC応答をアッセイした。第6日にELISAを行ってIgMの抗TNP応答を測定した。100  $\mu$ gのChi-L6/ミウバン/マウスの腹腔内免疫感作によって、異種の免疫グロブリンChi-L6に対する一次応答を産生した。血清IgM抗Chi-L6抗体反応を第7日に測定した。25  $\mu$ gのTNP-Ficollの腹腔内免疫感作によって、TNP-Ficollに対する一次免疫応答を産生した。IgMの抗TNP応答をELISAによって第6日に測定した。

二次免疫応答： KLHに対する二次体液性応答を産生するために、KLH/

CFA (50  $\mu$ g, 腹腔内) で実験動物を免疫感作した。続いて3カ月後に、マウスを10  $\mu$ gの可溶性KLH (腹腔内) にチャレンジさせた。イソタイプ特異的ELISAを用いて免疫感作マウスの血清中の抗KLH抗体反応を第7日に測定した。Ch i - L 6免疫感作マウスを10  $\mu$ gの可溶性Ch i - L 6 (腹腔内) にチャレンジさせることによって、Ch i - L 6に対する二次抗体反応を産生した。血清Ig G<sub>1</sub>抗Ch i - L 6抗体反応を第7日に測定した。

抗g 39処置: 各実験において指示した免疫感作またはチャレンジ後第0日、第2日および第4日に、滅菌したHPLC精製抗g 39 (MR1) またはHIg (抗体対照として) を投与した (腹腔内)。

抗原特異的ELISA: イソタイプ特異的ELISAを用いて、抗原特異的Ig M、Ig G<sub>1</sub>、Ig G<sub>2a</sub>、Ig G<sub>2b</sub>、Ig G<sub>3</sub>およびIg Eの抗体力価を測定した。要約すると、抗原 (PBS中の1mg/mlのKLH、Ch i - L 6、TNP<sub>16</sub>-BSAまたはTNP<sub>2</sub>-BSA) をフレキシブルポリビニルマイクロタイター皿の上に4℃で一晩吸着させる。プレートを洗浄し、PBS-1%FCS-アジ化ナトリウムでブロックする。希釈した血清サンプルを37℃で2時間インキュベートする。サンプルを洗浄し、次のアルカリホスファターゼ結合検出抗体のひとつを用いて抗原特異的抗体力価を測定する: ヤギ抗マウスIg M、Ig G<sub>1</sub>、Ig G<sub>2a</sub>、Ig G<sub>2b</sub>、Ig G<sub>3</sub> (サザン・バイオテクノロジー, バーミンガム, AL)。ビオチン結合B1E3、次いでアルカリホスファターゼアビジン (サウス・サンフランシスコ, CA) を用いて、Ig E特異的ELISAを検出した。すべてのELISAを、アルカリホスファターゼとフォスファターゼ基質 (シグマ・ケミカル・コーポレーション, セントルイス, MO) との反応によって展開した。ダイナテックMR700ELISAリーダーを用い、410nmにおいてプレートを分析した。単位は、標準免疫血清の滴定曲線に基づく任意値を表す。すべての実験グループを1:100から1:1000,000の範囲で滴定し、多重点分析に基づいて力価を決定した。非チャレンジ対照における抗KLH、抗Ch i - L 6および抗TNP抗体の濃度を下記のようにして検出した。

血清抗g p 39の検出:

抗gp39処置マウスの血清中の活性化していない抗gp39の定量: 750  $\mu$ gの抗gp39を投与された(第0日、第2日および第4日に250  $\mu$ gずつ投与)マウスからの血清を、抗gp39処置開始後第7日、第14日および第21日に採取した。非還元条件下で血清を7.5% SDSゲルに載せ、ニトロセルロースに転写し、HRPO結合RG7でプロットした。化学発光検出法を用いて、150~165 kDaに対応する領域を走査し、アップル・スキャナーおよびイメージ4.1ソフトウェアプログラムを用いて計数化した。

処置マウスの血清中の生物学的に活性な抗gp39の分析: 抗CD3活性化Th1(gp39を示す)を、750  $\mu$ gの抗gp39投与マウス(第0日、第2日および第4日に250  $\mu$ gずつ投与)からの血清の希釈物で固定し、血清中に残る生物学的に活性なgp39を定量した。抗gp39含有血清の滴定物をTh1細胞クローンとともに4℃で30分間インキュベートし、次いで洗浄し、続いてFITC-RG7とともに4℃で30分間インキュベートした。精製抗gp39を用いてMFIに対する抗gp39濃度の標準曲線を作成した。ベクトン・ディッキンソン・FACSキャンでサンプルを分析し、標準曲線に基づいて血清中に残る抗gp39のパーセントを求めた。第7日の抗gp39の濃度パーセントを100%と設定した。

ヘルパーT細胞の養子移入: SRBC(200  $\mu$ lの1%SRBC, 静脈内)でマウスを免疫感作し、抗gp39またはHIgを投与した(第0日、第2日および第4日に250  $\mu$ gずつ投与)。第7日に非免疫感作あるいはSRBC免疫感作マウスから脾細胞を取り出し、赤血球を除去し、洗浄し、免疫感作B細胞源としてTNP-KLH感作(TNP-KLH-CFA, 50  $\mu$ g, 腹腔内)マウスの脾臓細胞 $5 \times 10^6$ 個を加えて、あるいは加えずに、照射宿主(600ラド)に移入した(静脈内、 $50 \times 10^6$ 個/マウス)。移入時に、マウスをTNP-SRBC(200  $\mu$ lの1%TNP-SRBC, 静脈内)で免疫感作した。移入後第7日に血清IgG<sub>1</sub>抗TNP力価を決定した。

#### 実施例1

抗gp39は赤血球抗原に対する一次抗体反応の産生を阻害する



HIM患者において観察されたTD免疫の減少、ならびに抗gp39の潜在的阻害効果およびTh依存性B細胞上のCD40-Igのインビトロ活性化が、インビボにおける体液媒介免疫に対する抗gp39の潜在的免疫抑制効果の実験のための基準となった。一次TD体液性免疫応答におけるgp39-CD40相互作用の役割を研究するために、ヒツジ赤血球細胞(SRBC)に抗gp39を投与して、一次抗体反応における抗gp39のインビボ投与の効果を測定した。実験動物をSRBCで免疫感作し、抗gp39mAb(または対照HIg)を4日間投与した。第5日に、抗gp39処置、HIg処置をしたマウスおよび対照マウスの一次抗SRBC抗体反応を決定した。合計1.5mgの抗gp39を投与した(500 $\mu$ g/マウスを第0日、第2日および第4日に投与)マウスのIgM抗SRBCブランク産生細胞(PFC)応答は、対照またはHIg処置したマウスの抗SRBC PFC応答と比べて99%減少した(図1A)。さらに、抗gp39が、300 $\mu$ g/マウス程度の投与(100 $\mu$ g/マウスを第0日、第2日および第4日に投与)であっても抗SRBC一次免疫応答は66%まで減少した。これらの実験結果から、gp39処置がインビボにおける一次抗体反応を取り除くことが示される。

続いて、SRBCに対する一次体液性免疫応答における抗gp39の免疫抑制効果の期間を測定した。SRBCで免疫感作したマウスを抗gp39で4日間処理し、処置後の種々の時点で一次抗SRBC応答を起こす能力をアッセイした。この実験においては、第0日にすべての実験動物をSRBCで免疫感作し、第0日、第2日および第4日に抗gp39またはHIgを投与した。さらなるSRBC免疫感作グループを第7日または第14日にSRBCにチャレンジさせた。各抗原チャレンジ後第5日(それぞれ第12日および第19日)に、IgM抗SRBC応答を測定した。このような実験の結果を図1Bに示した。図1Aに示されるように、一次抗SRBC応答は、抗gp39投与開始後第5日で80~90%阻害された。さらに、抗gp39処置後第12日および第19日の一次抗SRBC応答もまた90%以上阻害された。これらの結果から、短期間の抗gp39処置によって一次抗体反応が持続的に阻害されることが示される。

## 実施例 2

### 抗 g p 3 9 は二次 K L H 抗体反応の産生を阻害する

一次抗体反応を審査する実験は、一次体液性免疫の開始において、g p 3 9 - C D 4 0 相互作用が重大な役割を演じることを示唆している。しかし、これらの実験からは、g p 3 9 依存性 C D 4 0 シグナリングにおいて二次抗体反応の発生が必要であるかどうかについては明らかにはならない。したがって、可溶性 K L H へのチャレンジに対する二次免疫応答における抗 g p 3 9 投与の効果を K L H 免疫マウスにて測定した。

一次抗 S R B C P F C 応答を減少する抗 g p 3 9 投与スケジュールを用い、二次抗体反応における抗 g p 3 9 処置の効果を評価するための実験を設計した。これらの実験において、K L H 免疫マウス (C F A および K L H 処置の 3 カ月前に免疫感作) を可溶性 K L H にチャレンジさせた (1 0  $\mu$ g / マウス / 静脈内)。抗原チャレンジ当日 (第 0 日) に、マウスに 2 5 0  $\mu$ g の抗 g p 3 9 または H I g も与え、続いて第 2 日および第 4 日に抗 g p 3 9 または H I g を与えた。K L H チャレンジから第 7 日 (図 2 A) および第 1 4 日 (図 2 B) に、マウスから採血して I g M、I g G<sub>1</sub>、I g G<sub>2a</sub>、I g G<sub>2b</sub>、I g G<sub>3</sub> および I g E 抗 K L H 抗体の力価を測定した。その結果から幾つかの点が実証される: 1) 可溶性 K L H へのチャレンジは、1 4 日まで持続する持続性の二次免疫応答を誘発した; 2) 抗 g p 3 9 の投与は、等量の H I g の投与と比較した場合、測定されたイソタイプの二次抗 K L H 応答を有意に減少した; 3) 抗 g p 3 9 の免疫抑制効果は、抗 g p 3 9 処置の開始後少なくとも 1 4 日間持続すると思われた。まとめて言えば、これらの実験の結果から、一次体液性免疫応答と同様に、抗 g p 3 9 によって二次体液性免疫の産生も遮断されることが証明される。

## 実施例 3

### 抗 g p 3 9 は異種 I g に対する抗体反応の産生を阻害する

図 1 に示した実験は、免疫原性の強い抗原 S R B C に対する一次応答中の抗 g p 3 9 の免疫抑制活性を証明している。赤血球に独特である強い免疫応答誘発能力は、赤血球の細胞的性質によるものである。異種 I g 分子は、免疫原性が高い

というこの特性を分け持っており、したがって、一次および二次抗体反応の産生における抗 g p 3 9 処置の効果を審査するためのモデル抗原系がさらに提供される。異種 I g 分子 C h i - L 6 (ヒト型マウス抗腫瘍細胞 m A b) で実験動物を免疫感作し、抗 g p 3 9 または対照 H I g で処置をした。7 日後、血清を採取し、I g M 抗 C h i - L 6 抗体の産生に対するアッセイを行った。最初の免疫感作および抗 g p 3 9 処置から 1 4 日後、マウスをさらに C h i - L 6 にチャレンジさせ、第 2 1 日における I g G<sub>1</sub> 抗 C h i - L 6 抗体の産生に対するアッセイを行った。図 3 は、このような実験のひとつの結果を描いたものである。抗 g p 3 9 処置マウスにおける C h i - L 6 に対する一次抗体反応は、H I g 処置マウスと比較した場合、9 0 % 以上阻害される。さらにその上、C h i - L 6 に対する二次 I g G<sub>1</sub> 応答が同様に阻害される。これらの結果から、抗 g p 3 9 処置によって、2 番目のタイプの T D 抗原、すなわち異種 I g に対する一次および二次抗体反応も、赤血球および可溶性タンパク質抗原に対する応答が抑制されるのと同じく効果的に抑制されることが実証される。

#### 実施例 4

抗 g p 3 9 は T-非依存性 I I 型抗原、すなわち T N P - F i c o l l に対する一次抗体反応の産生を阻害しない

これまでの実験では抗 g p 3 9 がインビボにおいて T D 抗原に対する一次および二次抗体反応の産生を効果的に遮断することが実証されているが、T I 抗原に対する体液性応答の開始において g p 3 9 - C D 4 0 相互作用がどのような役割を演じているかは明らかになっていない。添付の書類に記載したデータから、T I - I I 型抗原、すなわち T N P - F i c o l l による免疫感作の結果、インビボにおいて T h 細胞によって g p 3 9 が発現されることが示される。この T I 抗原に対する抗体反応の産生において g p 3 9 - C D 4 0 相互作用が必要であるかどうかを提示するために、T N P - F i c o l l で免疫感作されたマウスにおける抗 g p 3 9 処置の影響を評価した。T N P - F i c o l l または T N P - S R B C で免疫感作したマウスを抗 g p 3 9 または H I g で処置し、6 日後に I g M 抗 T N P 抗体反応を測定した。図 4 A は、T 抗原 T N P - S R B C で免疫感作した実験動物が

有意の抗TNP血清抗体反応を引き起こすことを示す。これまでの実験から予測されるように、抗gp39処置はこれらのマウスに産生された一次抗TNP反応を劇的に阻害する。反対に、TNP-Ficollで免疫感作したマウスの抗TNP抗体反応の力価は高い(図4B)；しかし、抗gp39処置はTNP-Ficollに対する抗体反応を阻害しない。これらの実験結果は、TD抗原に対する応答とは異なって、抗gp39はTNP-Ficollに対する体液性応答の産生を遮断しないことを実証し、TI抗原に対する応答がgp39非依存性であることを示唆している。

#### 実施例5

抗gp39投与はSRBC特異的Thを機能的には消去しない

これまでの実験から、抗gp39がTD体液性免疫の展開を妨害することがわかってい；しかし、抗gp39処置が体液性応答を抑制するメカニズムは明らかではない。抗gp39による免疫抑制は、1) gp39産生T細胞の負シグナリングがThアネルギーを引き起こすこと；2) mAbが媒介する抗gp39の細胞毒性消去がCD4<sup>+</sup>T細胞を産生すること；および/または3) gp39の遮断物がCD40に結合することによって媒介される。これらのメカニズムのうちどれが、抗gp39療法において観察された遅延型免疫抑制においてオペレーターとなりうるのかという洞察を得るために一連の実験を行った。抗gp39療法によって抗原特異的Thが消去あるいはアネルギー化される可能性を調査するために、gp39処置マウスからの抗原特異的Th機能を養子移入によって測定した。簡単にいうと、マウスをSRBCで免疫感作し(SRBC特異的Thを感作するために)、次いで抗gp39またはHIgを投与した(マウス一匹当たり、第0日、第2日および第4日に250μgずつ投与)。第7日に非免疫感作マウスからの脾細胞あるいはHIg処置または抗gp39処置マウスからのSRBC免疫感作脾細胞を、TNP感作B細胞源としてTNP-免疫感作脾細胞とともに宿主マウスに養子移入した。同時に、マウスをTNP-SRBCにチャレンジさせ、IgG<sub>1</sub>抗TNP力価を第5日に決定した。非免疫感作ドナーからの脾細胞を受容した宿主は、SRBC感作実験動物からの脾細胞を受容したマウスと比較した

場合、実質的に低いIgG<sub>1</sub>抗TNPを産生したという事実から示されるように、SRBC感作Tヘルパー細胞は、宿主マウスにおいて二次抗TNP反応が誘発されることを必要とする(図5)。さらに重要なことに、これらの実験結果は、HIg処置マウスおよび抗gp39処置マウスからのSRBCヘルパー活性が類似していることを示し、抗gp39処置がTh機能を変えたり、Thの感作を遮断したりしないことを示した。さらにその上、抗原応答性Thが移入の際にヘルパーエフェクター機能を提供したように、抗gp39処置の結果として抗原応答性Thが消去あるいはアネルギー化されるようなことはなかった。

#### 実施例6

##### ハムスター抗gp39のインビボにおけるクリアランス

これまでの研究によって、抗gp39(MR1)が、CD40に対するgp39の結合を遮断し(15)することが確立されており、このことは、抗gp39のインビボにおける免疫抑制効果がgp39-CD40相互作用の遮断によるものであるという仮説をサポートしている。この仮説が正しいと仮定すれば、抗gp39投与において観察された長期の免疫抑制には、宿主における抗gp39の持続性が必要である。免疫抑制が明らかに現れているときに抗gp39が検出されるかどうかを測定するために、抗gp39の血清からのインビボクリアランス速度を測定した。マウスには4日間の実験期間中を通して抗体を処方し(3×250μgの抗gp39)、抗体投与開始後第7日、第14日および第21日における血清中の抗gp39濃度を測定した。変形されなかったMR1に対するウェスタンブロット分析(160kd)は、抗体処置開始後少なくとも21日間は無傷の血清抗gp39を検出しうることを示した(図6A)。抗体療法開始後7日に分析された実験動物の血清からもたらされたシグナルと比較した場合、第21日における実験動物の抗gp39の血清中濃度はおよそ5%であった(走査デンストメトリーによる)。

無傷の抗gp39が血清中に存在することは測定されたけれども、抗gp39が生物学的に活性であるかどうかを確認することもまた重要で。したがって、4日間の実験期間中を通して3×250μgの抗gp39を受容したマウスの血清

を、g p 3 9 産生T h を染色するために用いた。最後の注射から3日後（抗体処置開始から7日後）の血清抗g p 3 9 濃度を100%とした。抗体療法開始後第14日には、およそ10~15%の生物学的に活性な抗g p 3 9 mAbが血清中に検出された。療法開始後第21日では、2~3%の抗g p 3 9 が血清中に残っていた。したがって、ウエスタンブロッティングによる無傷の抗g p 3 9 の測定および生物学的に活性な抗g p 3 9 の測定の両方から、抗g p 3 9 療法開始後21日目には、およそ5%の抗g p 3 9 が存在することが示された。これらの結果から、抗g p 3 9 の半減期が約12日であることが実証され、抗g p 3 9 による体液性免疫応答の持続的抑制が、T h 機能の持続的遮断によるものであるという仮説と一致する証拠が提示される。

本発明の研究は、インビトロにおいてg p 3 9-CD40相互作用を遮断する抗g p 3 9 抗体をインビボ投与することがTD抗原に対する一次および二次体液性免疫応答の両方を大いに阻害し、T I-I型抗原に対する応答は阻害しないことを実証する。さらにこの研究は、抗g p 3 9 処置が抗原感作T h 細胞の感作を遮断しないことを実証する。したがって、g p 3 9-CD40というリガンド-受容体対を、体液性免疫応答を治療する際の標的として用いることができる。

抗g p 3 9 の体液性免疫におけるその免疫抑制効果がどのように作動するかという洞察を得るために、T h 機能における抗g p 3 9 の直接的効果を提出した。データは、抗g p 3 9 処置マウスのSRBC免疫感作T h が、養子移入に際してのヘルプを提供することが完全に可能であったことを示し、抗g p 3 9 処置がインビボにおいてT h の消去やアネルギー化を引き起こさないことを示唆している。これらの結果から、抗g p 3 9 は、CD40へのg p 3 9 の結合を遮断することによってその免疫抑制効果を媒介するのであり、g p 3 9 産生T h の不活性化によるものではないという考察が導かれた。この仮説のサポートとして、抗g p 3 9 がCD40のg p 3 9 への結合を遮断するというインビトロ研究が行われた(16)。さらに、免疫抑制が現れている期間中に、生物学的に活性な抗g p 3 9 を血清中で検出することができた。免疫抑制が明らかであるときに、血清中にはたっ

た5%の抗gp39しか存在しないけれども、血清中の抗gp39の濃度と比較して、二次リンパ器官の特定の部位における抗gp39の局所的組織中濃度は、より高く、そしてクリアランス速度はより低くなることが可能である。抗gp39によるマウスの処置は、SRBCおよび異種Igに対する一次免疫応答を90%以上阻害し、その阻害は持続性であった。gp39の機能を遮断することによって抗gp39が阻害を媒介していると仮定すると、これらのデータは、TD抗原に対する一次免疫応答の展開に必須であるgp39-CD40相互作用に関係してくる。免疫組織化学的分析によって、gp39がTD抗原による免疫感作の結果として誘発され、機能的に重要であることが確認される。gp39発現のインシトゥ研究は、一次体液性免疫応答中のgp39-CD40相互作用の開始部位が細動脈周囲リンパ球組織鞘(PALS)の末梢部分および末端細動脈(TA)の周囲にあることを例証している。gp39発現Thと抗原特異的B細胞間の複合体が並んでいるのが見られたのは、これらの部位においてであり、外層PALSが、一次体液性免疫応答中のT細胞-B細胞相互作用の主要部位であることが示唆される。したがって、PALSは、抗gp39がgp39発現Th細胞と相互作用して最終的にT-B相互作用およびそれに続くIgの産生を阻害する部位である。

一次免疫応答と同様に、CFA中のKLHで感作したマウスの二次体液性免疫応答もまた抗gp39の投与によって阻害されることも示された。抗gp39による抗SRBC PFCの減少と一致して、抗原チャレンジに対する血清中抗体力価の減少も観察された。測定された血清中の全抗KLH Igイソタイプ(IgM、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub>、IgG<sub>3</sub>およびIgE)の力価が、マウスの抗gp39処置によって減少した。抗gp39投与の効果は、第2の抗原チャレンジ後少なくとも14日間現れ、抗gp39による持続性免疫抑制を確認した。異種Igおよび異種赤血球に対する二次免疫応答もまた、抗gp39療法によって阻害されるので、KLHに対する二次応答の抗gp39による免疫抑制は、KLHに対してのみ見られるものではない。gp39発現Thの解剖学的分布は、一次免疫感作において観察されるものと同じであったが、免疫感作脾臓中のgp

39発現Thの頻度は一次免疫応答中に観察されるものより増加した。免疫感作脾臓の胚中心または小胞では、gp39発現Thは発見されなかった。したがって、脾臓のPALsおよびTA中の活性化Th細胞に应答してB細胞が触発され、その後小胞および胚中心へ移動することが明らかである。

本研究の焦点は、TD体液性免疫のコントロールにおける抗gp39の潜在的用途を明らかにすることであった。抗gp39を用いる簡便な治療処方によって、この治療用抗体の魅力的な属性である、持続性の抑制が得られた。特に興味深いことは、抗gp39が、他の異種治療用抗体（Chi-L6など）に対する一次および二次体液性応答を予防する能力をもっていることである。このことによって、異種治療用抗体を患者に繰り返し投与できるようになる。

#### 実施例7

抗gp39抗体の産生および特徴付け

##### 実験1—ヒトgp39に対する抗体

ヒト被験者において抗原特異的なT細胞寛容を誘導するには、ヒトgp39に対する抗体を投与するのが好ましい。マウス抗ヒトgp39モノクローナル抗体を作製するため、以下の方法を用いた。Balb/cマウスを完全フロイントアジュバント（CFA）中の可溶性gp39融合タンパク質、gp39-CD8で免疫した。引き続き、マウスを不完全フロイントアジュバント（IFA）中の可溶性gp39-CD8で6週間後に攻撃した。二次免疫の4週間後に可溶性gp39-CD8を可溶性の形態で与えた。ついで、2週間後にマウスを活性化ヒト末梢血リンパ球でブースター処理し、ついでさらに2週間後に活性化gp39-CD8で最後のブースター処理を行った。最後の免疫から4日目に標準プロトコールに従って脾臓細胞をNS-1融合相手と融合させた。

抗gp39抗体を産生する細胞を、複数スクリーニング法に基づいて選択した。クローンをまず、gp39-CD8を用いたプレート結合アッセイによりスクリーニングした。ついで、陽性のクローンを対照のCD8融合タンパク質であるCD72-CD8に対してスクリーニングした。CD8-CD72プレート結合アッセイで陽性とされたクローンを排除した。残ったクローンを、引き続き休止



び6時間活性化ヒト末梢血リンパ球(PBL)上でスクリーニングし、ついでフローサイトメトリー分析を行った。活性化されたPBLは染色するが休止PBLは染色しないハイブリドーマを陽性とした。最後に、残りのクローンをgp39の結合したプレートへのCD40Igの結合を阻止する能力について試験した。

プレート結合アッセイにおいて、約300クローンがgp39-CD8およびCD72-CD8に対して最初にスクリーニングされた。これらクローンのうち、30のクローンはプレートに結合したgp39を検出するがCD8は検出しないことがわかった。引き続き、これらクローンを活性化ヒトPBL上のgp39の検出についてスクリーニングした。約15のクローンが活性化PBL上の分子を検出したが、休止細胞上の分子は検出しなかった。これらクローンがプレートに結合したgp39のCD40Ig検出を阻止する能力を決定することにより特異性をさらに確認した。10のクローンのうち3つのクローンが、このアッセイにおいてCD40Ig結合を阻止することが試験された。これらクローンは、3E4、2H5および2H8であった。かかるクローンは本発明の方法に使用するのに好ましい。活性化PBLでは陽性だが休止PBLでは陽性ではないと試験されたクローンを、活性化されたラットT細胞クローンであるPOMC8との反応性についてもスクリーニングした。クローン2H8はこのラットT細胞株との交差反応性を示した。

#### 実験2-ヒトgp39に対する抗体

実験1と同様の免疫手順を用い、ヒトgp39に対する別の抗体を産生させた。1匹のBalb/cマウスをCFA中の可溶性gp39-CD8で免疫し、ついで4週間後に6時間活性化ヒト末梢血リンパ球で攻撃した。脾臓細胞をNS-1融合相手と標準プロトコールに従って融合させる4日前に、マウスを可溶性gp39-CD8でブースター処理した。ハイブリドーマクローンのスクリーニングを6時間活性化ヒトPBLのフローサイトメトリー染色により行った。活性化ヒトPBLは染色するが休止ヒトPBLは染色しないクローンを選択した。6つのクローン、4D9-8、4D9-9、24-31、24-43、89-76および89-79を選択し、さらに分析した。

これら選択した抗体の特異性を幾つかのアッセイにより確認した。まず、フローサイトメトリー分析は、6つのすべてのmAbが活性化末梢血T細胞を染色するが休止末梢血T細胞は染色しないことを示した（代表的な例について図7Bおよび7Cを参照、それぞれ、活性化T細胞の4D9-8および4D9-9による染色を示す）。これら6つの抗体のそれぞれによって認識される分子の発現は、活性化の4時間以内には検出可能であり、活性化の6~8時間で最大であり、活性化の24時間後には検出できない。6つのすべてのmAbは活性化CD3<sup>+</sup>PBL上に発現される分子（主としてCD4+表現型の）を認識するが、CD8<sup>+</sup>T細胞の一部もまた該分子を発現する。これら6つのmAbによって認識される分子の発現は、gp39の発現と同様に培地中のシクロスポリンAの存在によって抑制される（代表的な例について図8Aおよび8Bを参照、それぞれ、シクロスポリン処理T細胞の4D9-8および4D9-9による染色を示す）。これら6つのmAbによって認識される分子の発現の動力学および分布は、ヒトCD40Igの融合タンパク質によって検出されるようにgp39のものと同一である。加えて、これら6つのすべてのmAbはCD40Igによるgp39の染色を阻止する（代表的な例について図9Aおよび9Bを参照、それぞれ、4D9-8および4D9-9の存在下でのCD40Igによるgp39染色の抑制を示す）。ELISAアッセイにおいて、これら6つのすべてのmAbは可溶性融合形態のgp39分子であるgp39-CD8を認識する。さらに、これら6つのすべてのmAbは、<sup>35</sup>S-メチオニン標識した活性化ヒトPBLから約36kdの分子を免疫沈降させる。この免疫沈降した分子は、ヒトCD40Ig融合タンパク質によって沈降したものと同一である。

上記6つの選択したmAb（4D9-8、4D9-9、24-31、24-43、89-76および89-79）の機能的活性を以下のようにしてアッセイした。まず、IL-4および可溶性gp39とともに培養した精製ヒトB細胞の増殖をmAbが抑制する能力を測定した。精製ヒトB細胞を、精製モノクローナル抗体またはCD40Ig（0~12.5μg/mlの範囲の投与量）の存在下または不在下でgp39およびIL-4とともに培養した。培養3日後にチミジ

ン導入によりB細胞増殖を決定した。得られた結果(図10に示す)は、6つのすべてのmAbがgp39およびIL-4によって誘導されるB細胞増殖を抑制しうること示している。mAb89-76および24-31は誘導B細胞増殖の抑制において最も効果的であった。

つぎに、抗CD3抗体活性化T細胞およびIL-2によって誘導されるIg産生により測定されるように、B細胞分化をmAbが抑制する能力を調べた。精製IgD<sup>+</sup>ヒトB細胞をFACSによる陽性選択により調製し、ついで精製抗gp39モノクローナル抗体(0~10 $\mu$ g/mlの範囲の投与量)の存在下または不在下、抗CD3抗体活性化ヒトT細胞(マイトマイシンC処理)およびIL-2とともに6日間培養した。IgM、IgGおよびIgA産生を第6日目にELISAにより評価した。得られた結果(下記表3に示す)は、IgM、IgGおよびIgA産生によって測定されるように、これら6つのすべての抗体はT細胞依存性B細胞分化を抑制しうること示している。

#### 実験3—マウスgp39に対する抗体

本発明のひとつの具体例においては、gp39アンタゴニストは抗マウスgp39モノクローナル抗体、MR1である。次の方法でMR1モノクローナル抗体を産生し、それをgp39に対する他の抗体を産生するのに使用することができる。

5~10<sup>6</sup>の活性化Th1細胞(d1.6)を週に一回の間隔で6週間腹腔内投与して、ハムスターを免疫感作した。マウスTh1に対する血清の力価が、約1:10,000より大きい場合、免疫感作ハムスターの脾細胞およびNS-1を用いてポリエチレングリコールで細胞融合を行った。成長ハイブリドーマを含有するウェルの上清のフローサイトメトリーを行い、静止期および活性化Th1をスクリーニングした。MR1を誘導するために、選択的に活性化Th1を認識するMa bを産生する特別なハイブリドーマをさらに試験してサブクローニングを行った。腹水中でMR1を産生し、イオン交換HPLCにて精製した。ハイブリドーマMR1は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、受託番号HB11048を付与された。

下記の文献は、実施例および発明の詳細な説明中に、番号で引用したものである。

1. イナバ K., M. D. ウィットマー, R. M. シュタインマン (1984年) “インビトロにおける一次抗体反応中の樹枝状細胞、ヘルパーT細胞およびB細胞のクラスター形成” 「J. Exp. Med.」 160: 858。
2. イナバ K., R. M. シュタインマン (1985年) “樹枝状細胞によって開始されるタンパク質特異的ヘルパーTリンパ球形成” 「Science」 229: 475。
3. ノエル R. J., E. C. スノー (1991年) “ヘルパーT細胞およびB細胞の同種の相互作用” 「Immunol. Tod.」 11: 361。
4. ゴードン J., M. J. ミルサム, G. R. ガイ, J. A. レッドベター (1987年) “新規なB細胞再刺激アッセイにおいて見られたインターロイキン4および抗Bp50 (CDw40) 間の相乗的相互作用” 「Eur. J. Immunol.」 17: 1535。
5. クラーク E. A., J. A. レッドベター (1986年) “2つの別個の細胞表面分化抗原によって媒介されたヒトB細胞の活性化” 「Proc. Natl. Acad. Sci. U SA」 83: 4494。
6. スタメンコヴィック I., E. A. クラーク, B. シード (1989年) “神経成長因子需要体に関連し、がん腫中のサイトカインによって誘発されたBリンパ球活性化分子” 「EMBO」 8: 1403。
7. ホーレンバーフ D., L. グロスマア, C. D. クラス, N. J. チャラップニー, R. J. ノエル, I. スタメンコヴィック, J. A. レッドベター, A. アルッフオ (1992年) “TNF遺伝子ファミリーの一員であるヒトT細胞抗原p39は、CD受容体に対するリガンドである: B細胞共同刺激性活性化をとまうgp39の可溶性体の発現” 「EMBO」 11: 4313。
8. アーミテージ R. J., W. C. ファンスロー, L. ストロックバイン, T. A. サトウ, K. N. クリフォード, B. M. マクダッフ, D. M. アンダーソン, S. D. ギンベル, T. デイビススミス, C. R. マリセフスキー, E. A. クラーク, C.

- A. スミス、K. H. グラブスタイン、D. コスマン、M. K. スプリッグス (1992年) “CD40に対するマウスリガンドの分子および生物学的特性” 「Nature」357:80。
9. ヴァレ A.、C. E. ツーベル、T. デフランクス、O. ジョッソウ、R. M. デ、J. バンジャルー (1989年) “CD40およびインターロイキン4を介するヒトBリンパ球の活性化” 「Eur. J. Immunol.」19:1463。
10. ゴードン J.、M. J. ミルサム、R. L. フローレス、S. ギリス (1989年) “補助分子インターロイキン4、CD23およびCD40の表面を介する休止期および間期ヒトBリンパ球の調節” 「Immunology」68:526。
11. ジャバラ H. H.、S. M. フー、R. S. ゲーハ、D. ベルセリ (1990年) “CD40およびIgE: 高純度ヒトB細胞によるIgE合成の誘発における抗CD40モノクローナル抗体とインターロイキン4間の相乗作用” 「J. Exp. Med.」172:1861。
12. バンジャルー J.、F. ルーッセット (1991年) “CD40系における成長ヒトBリンパ球” 「Nature」353:678。
13. アーミテージ R. J.、T. A. サトウ、B. M. マクダッフ、K. N. クリフォード、A. R. アルバート、C. A. スミス、W. C. ファンスロー (1992年) “生物学的にかっせいなCD40リガンド源の同定” 「Eur. J. Immunol.」22:2071。
14. レイン P.、A. トラウネッカー、S. ヒューベル、S. イヌイ、A. ランザベッキア、D. グレイ (1992年) “活性化ヒトT細胞は、Bリンパ球のT細胞依存性の活性化に関連するヒトB細胞関連抗原CD40に対するリガンドを送り出す” 「Eur. J. Immunol.」22:2573。
15. ノエル R. J.、J. A. レッドベター、A. アルッフォ (1992年) “CD40とそのリガンド、胸腺依存性B細胞の活性化にとって必須のリガンド受容体ペア” 「Immunol. Tod.」13:431。
16. ノエル R. J.、M. ロイ、D. M. シェファード、I. スタメンコビッチ、J. A. レッドベター、A. アルッフォ (1992年) “活性化Tヘルパー細胞上

の新規リガンドはCD40に結合し、B細胞の同種の活性化のための信号を変換する” [Proc. Natl. Acad. Sci. USA] 89: 6550。

17. アレン R. C., R. J. アーミテージ, M. E. コンリー, H. ローゼンブラット, N. A. ジェンキンス, N. G. コープランド, M. A. ベデル, S. エデルホフ, J. ディステッチェ, D. K. シモース, W. C. ファンスロー, J. ベルモン, M. K. スプリッグス (1993, 年) “C40リガンド遺伝子におけるX染色体性高IgM症候群に対する応答性の欠如” [Science] 259: 990。

18. アルッフォ A., M. ファーリントン, D. ホーレンバーフ, リー X., A. ミラトビッチ, S. ノノヤマ, J. バジョラス, L. S. グロスメア, R. ステンカンブ, M. ノイバウアー, R. L. ロバーツ, R. J. ノエル, レッドベター, U. J. A. フランク, H. D. オークス (1993年) “X染色体性高IgM症候群患者由来の活性化されたT細胞において、CD40のリガンドであるgp39が欠如している” [Cell] 72: 291。

19. ディサント J. P., J. Y. ボネフォイ, J. F. ゴーチャット, A. フィッシャー, G. デセイントベイジル (1993年) “高IgMを伴うX染色体性免疫不全におけるCD40リガンド突然変異” [Nature] 361: 541。

20. コーサウアー U., D. グラフ, H. W. マージス, F. ブライアース, M. バダヤッキー, S. マルコム, A. G. ウガジオ, L. D. ノタランジェロ, R. L. レビンスキー, A. クロチェク (1993年) “T細胞CD40リガンドの発現欠損は、高IgMを伴うX染色体性免疫不全を引き起こす” [Nature] 361: 539。

21. カートジョーンズ E., S. ハンバーグ, J. オハラ, W. E. パウル, A. K. アバス (1987年) “ヘルパー/インデューサーTリンパ球の異質性, I. リンホカインの産生” [J. Exp. Med.] 166: 1774。

22. スプリンガー T. A., A. バッタチャリヤ, J. T. カルドーザ, F. サンチェスマドリッド (1982年) “IgG1, IgG2aおよびIgG2bサブクラスに特異的なモノクローナル抗体およびκ鎖モノタイプおよびアロタイプ決定基: ラットモノクローナル抗体と共に用いる試薬” [Hybrid] 1: 25。

23. ヘルストーム I. (1986年) “ヒト肺がんに対して誘発されたモノクローナルマウス抗体” 「Cans. Res.」 46 : 3917。
24. ウィルド D. B.、P. マラック、J. カプラー、D. P. ダイアリナス、F. W. フィッチ (1983年) “クラス I MHC 抗原反応性において L3L4 が関係している証拠：モノクローナル抗体 GK1.5 (抗 L3L4a) がクラス I MHC 抗原特異的増殖、リンホカインの放出およびクローン化されたマウスヘルパー T リンパ球株による結合を遮断する” 「J. Immunol.」 131 : 2178。
25. スノウ E. C.、R. J. ノエル (1987年) “ハプテン特異的 B リンパ球の胸腺依存性抗原刺激” 「Immunol. Rev.」 99 : 173。
26. ジャーン N. K.、C. ヘンリー、A. A. ノーディン、H. フジ、A. M. コロスおよび I. レフコビッツ (1974年) “ブラーク形成細胞：方法論および理論” 「Transplant Rev.」 18 : 130。
27. オークス H. D.、R. J. ウエッジウッド (1989年) “B 細胞系の疾患” 「幼児および小児における免疫学的疾患」第3版、E. R. シュライム編 (フィラデルフィア：W. B. Сонダース)，pp 226。
28. ノタランジェロ L. D.、M. デュース、A. G. ウガジオ (1992年) “高 IgM (HIM) を伴う免疫不全” 「Immunol. Rev.」 3 : 101。
29. シズル J. A.、S. A. アルターズ、C. G. ファスマン (1992年) “療法における抗 CD4 モノクローナル抗体：非クラス的寛容の創製” 「Immunol. Rev.」 129 : 103。
30. リンスリー P. S.、P. M. ウォーラス、J. ジョンソン、M. G. ギブソン、J. L. グリーン、J. A. レッドベター、C. シン、M. A. テッパー (1992年) “CTLA-4 T 細胞活性化分子の可溶性体によるインビボ免疫抑制” 「Science」 257 : 792。
31. レンショウ D. J.、Y. ツェン、J. R. シスルスウェイト、A. モンターグ、W. ブラディ、M. G. ギブソン、P. S. リンスリー、J. A. ブルーストーン (1992年) “CTLA4 1 g によって誘導された異種臓器移植における長期

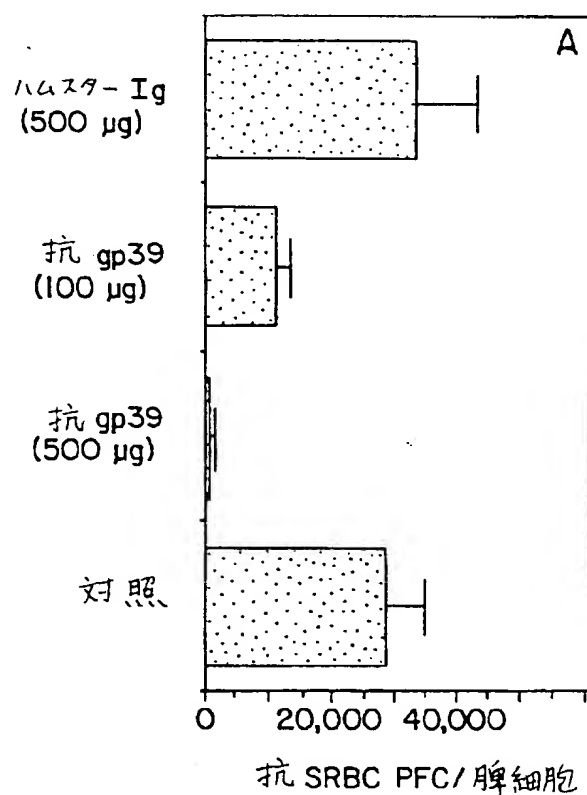
生存” 「Science」 257 : 789。

# 等価物

当業者であれば、ルーチン実験のみを用いて、本発の特定の具体例に対する多数の等価物について認識し、理解し得るであろう。このような等価物も本発明の請求の範囲に包含されることを意図されている。

【図1】

FIG. 1A





【図1】

FIG. 1B

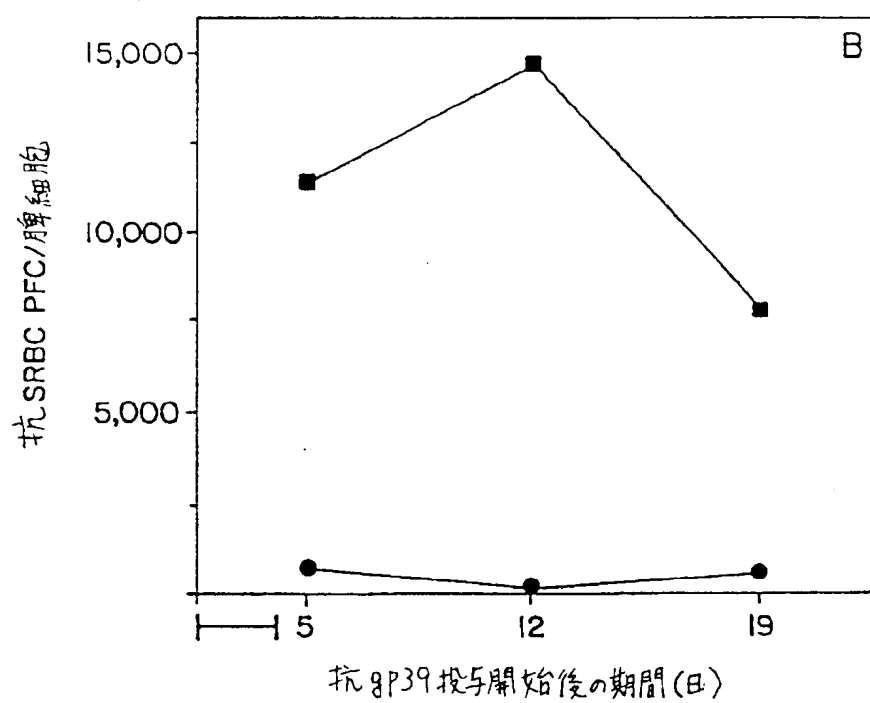


FIG. 2A

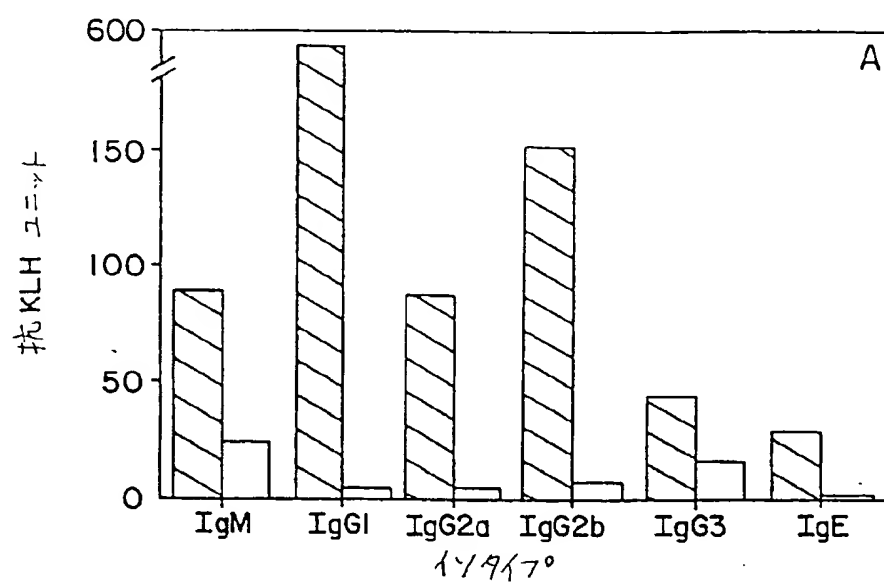


FIG. 2B

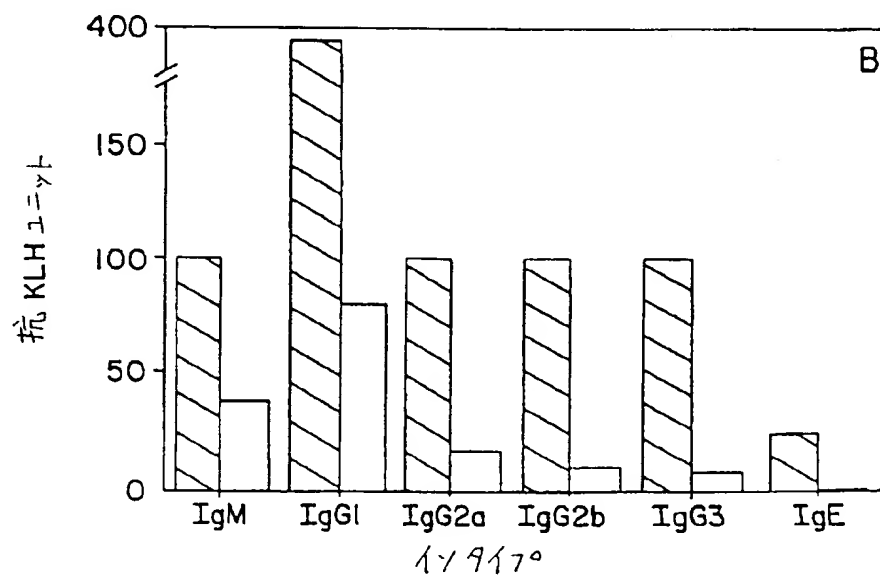


FIG. 3A

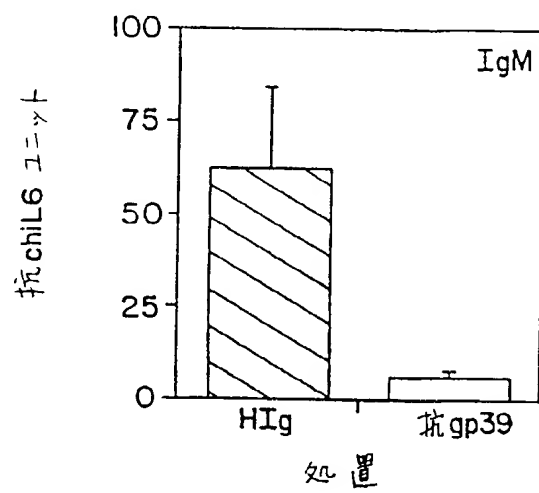


FIG. 3B

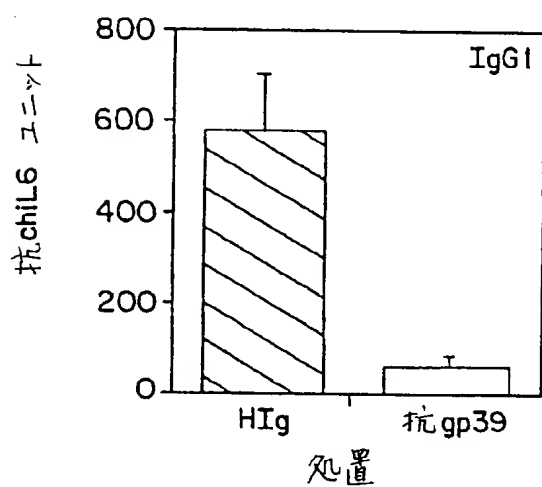


FIG. 4A

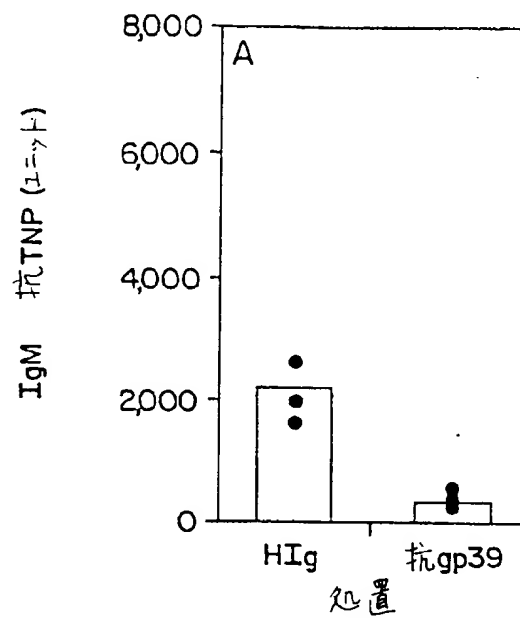


FIG. 4B

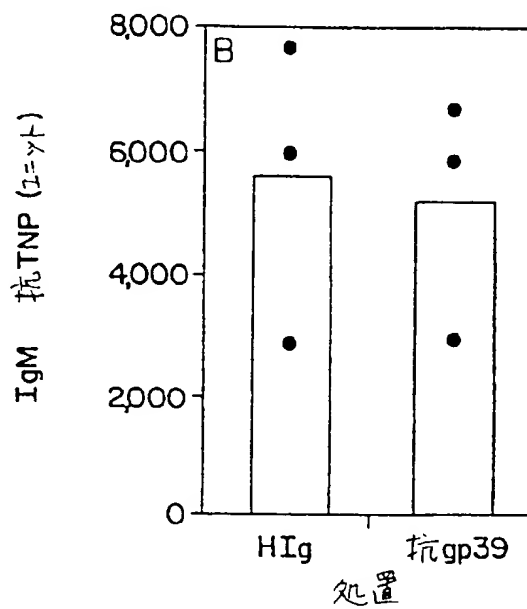
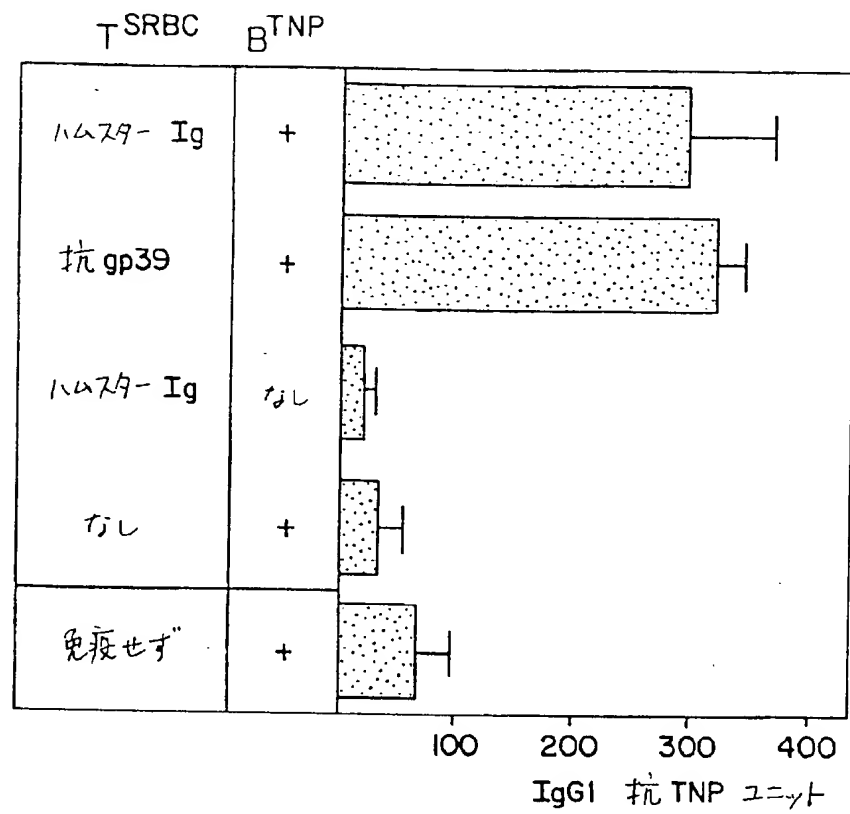


FIG. 5



【図6】

FIG. 6A

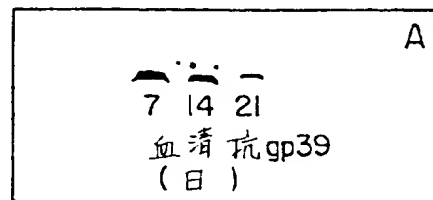


FIG. 6B

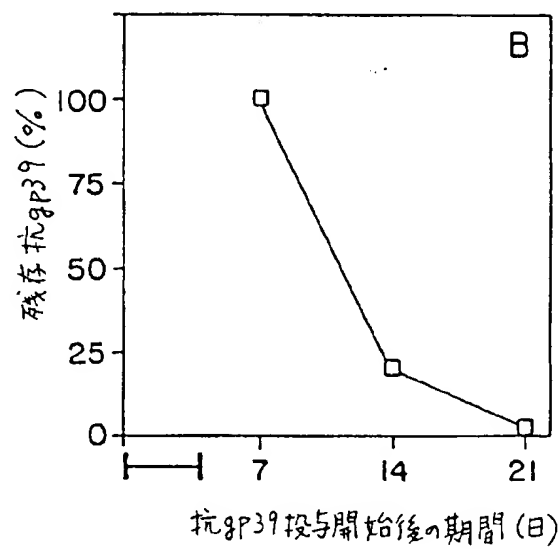


FIG. 7A

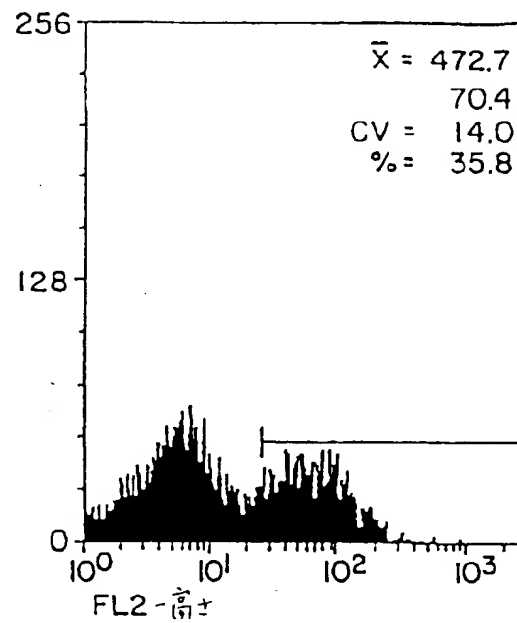
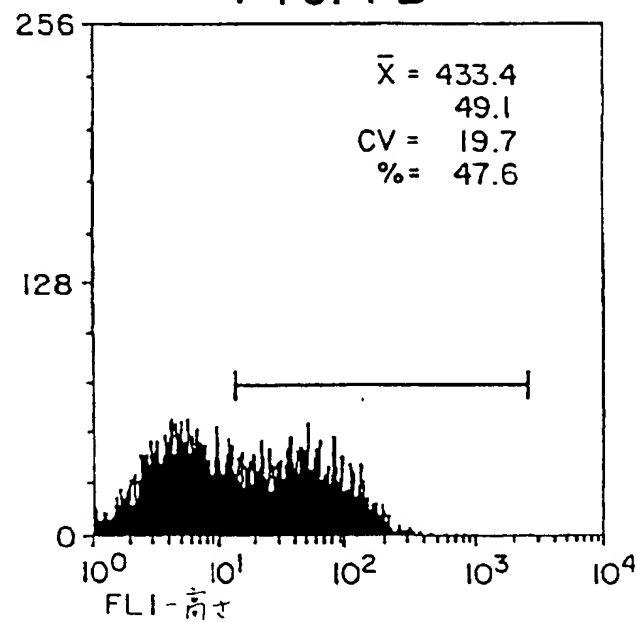
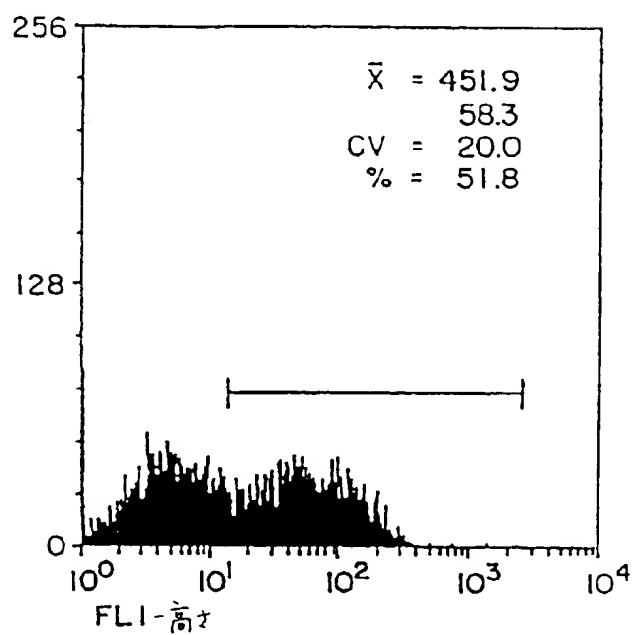


FIG. 7B



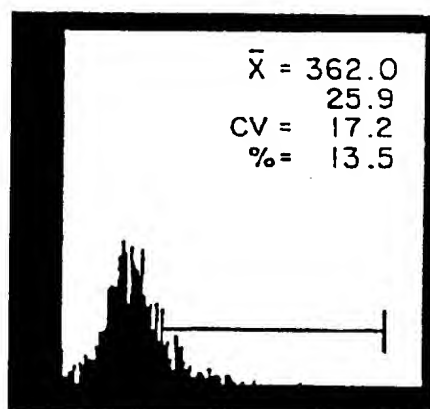
【図7】

FIG. 7C



【図8】

FIG. 8A





【图8】

FIG. 8B

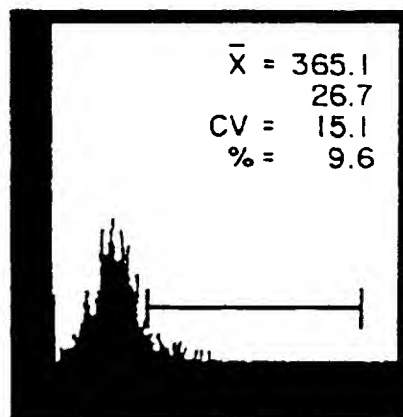
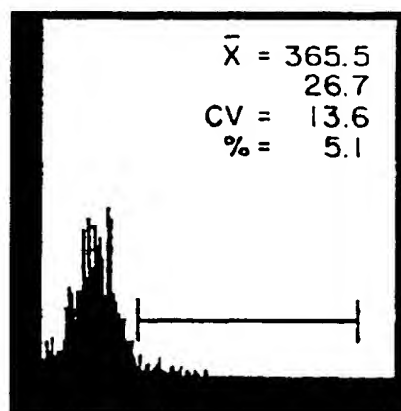


FIG. 8C



【図9】

FIG. 9A

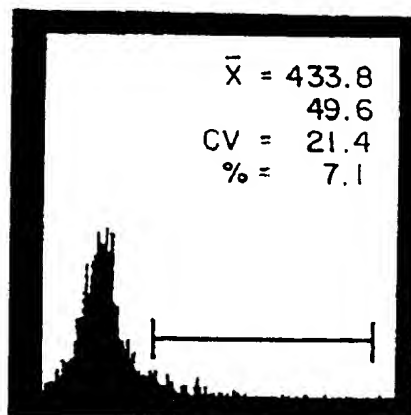


FIG. 9B

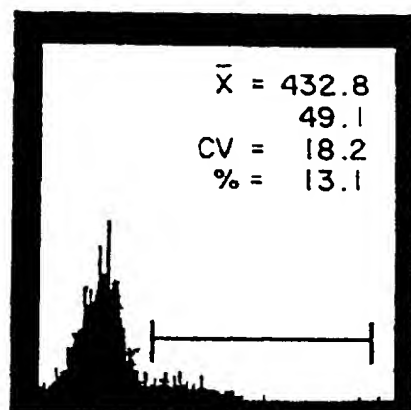
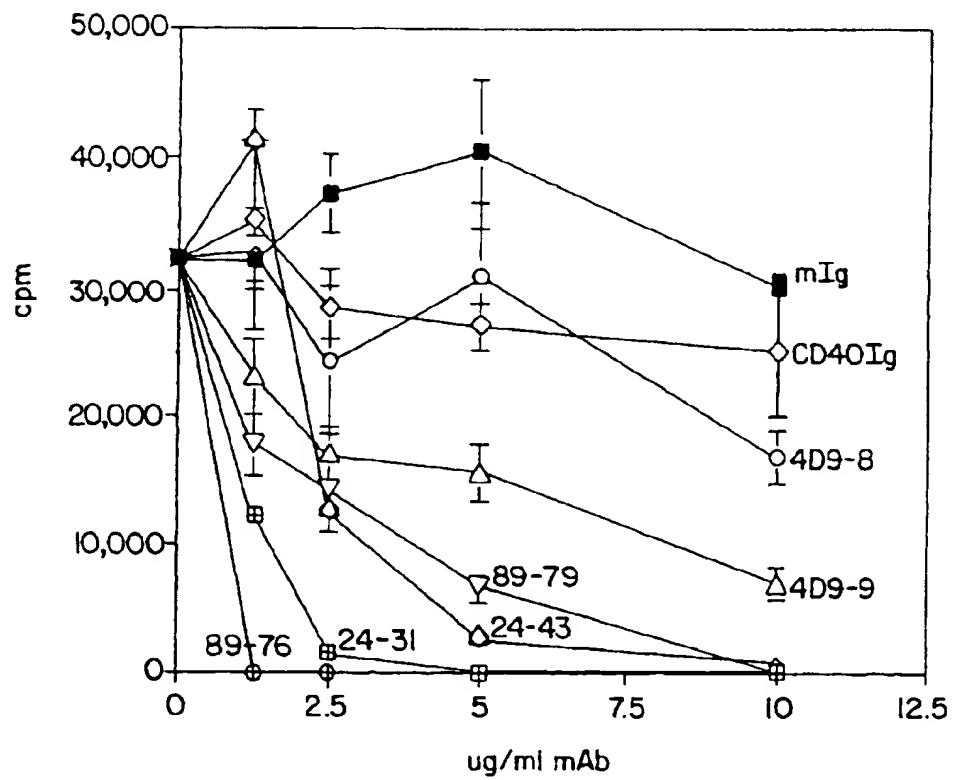
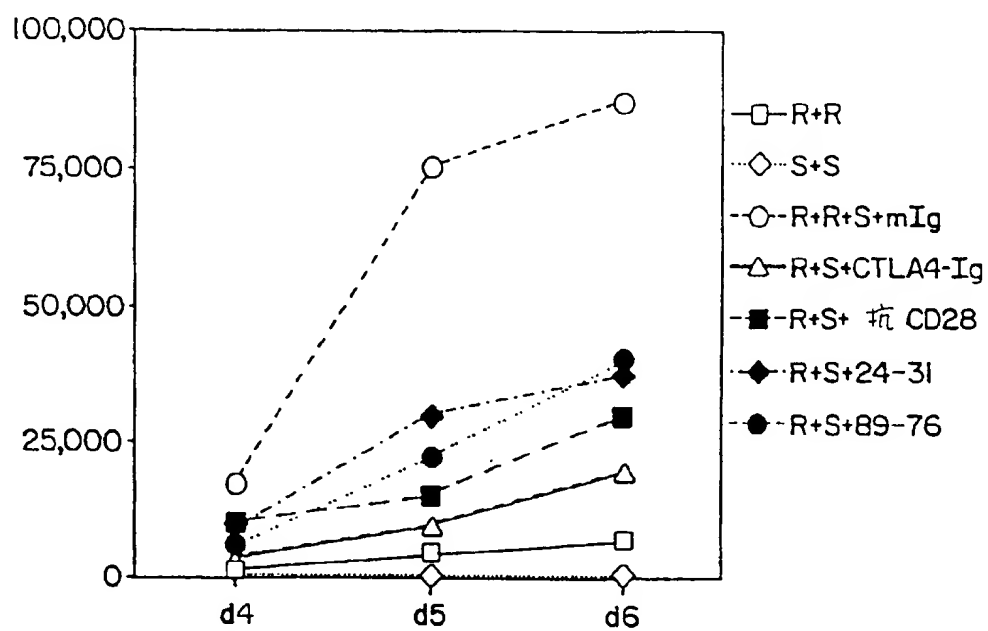


FIG. 10



【図11】

FIG. 11



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 94/09872

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 A61K39/395 A61K38/17 G01N33/68 //C12P21/08				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K G01N				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	EP,A,0 555 880 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY ET AL.) 18 August 1993  see column 14, line 4 - column 20, line 41 see claims	1-8,10, 13-18, 28-30, 33-37, 41-46		
X	WO,A,93 08207 (IMMUNEX CORPORATION) 29 April 1993  see examples 7,8,12,13 see claims 15,18,19	1,2,4-6, 15,19, 25-28, 35-38, 41,43-45		
-/-				
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.				
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
<b>* Special categories of cited documents:</b> <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;">           "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            "E" earlier document but published on or after the international filing date            "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)            "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means            "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="vertical-align: top;">           "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention            "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art            "A" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search  14 December 1994		Date of making of the international search report  28.12.94		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-3040, Tx 31 631 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Nooij, F		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 94/09872

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to class No.
X	JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, vol.13, no.3, May 1993, NEW YORK NY, USA pages 165 - 174 L. MARSHALL ET AL. 'The molecular basis for T cell help in humoral immunity: CD40 and its ligand, gp39.' see page 167, right column, line 17 - line 28 see page 168, right column, line 49 - page 169, left column, line 38 see page 172, left column, line 10 - line 30 ---	1-10, 13-18, 28-30, 33-38, 41-45
X	IMMUNOLOGY TODAY, vol.13, no.11, November 1992, AMSTERDAM, THE NETHERLANDS pages 431 - 433 R. NOELLE ET AL. 'CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation.' see page 432, left column, line 6 - line 20 see page 433, left column, line 4 - line 21 ---	1-10,13, 14,18, 28-30, 33,34, 41-45
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol.89, no.14, 15 July 1992, WASHINGTON DC, USA pages 6550 - 6554 R. NOELLE ET AL. 'A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells.' cited in the application see the whole document ---	1-10, 13-18, 28-30, 33-37, 41-45
A	THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol.149, no.2, 15 July 1992, BALTIMORE MD, USA pages 655 - 660 W. FANSLÖW ET AL. 'Soluble forms of CD40 inhibit biologic responses of human B cells.' see abstract see page 657, right column, line 6 - page 658, right column, line 2 see page 658, right column, line 30 - page 659, left column, line 7 see table I --- -/--	1,2,4-6, 15-19, 25-28, 35-38, 41-45

Form PCT/ISA/218 (continuation of previous sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 94/09872

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol.178, no.5, 1 November 1993, NEW YORK NY, USA pages 1567 - 1575 T. FOY ET AL. 'In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39.' see abstract see discussion</p> <p>----</p>	<p>1-10,13, 14, 18-20, 23,24, 28-30, 33,34, 41-45</p>
P,X	<p>THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol.180, no.1, 1 July 1994, NEW YORK NY, USA pages 157 - 163 T. FOY ET AL. 'gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory.' see abstract</p> <p>-----</p>	<p>1-7,9, 10,13, 14, 28-30, 33,34, 41-45</p>

Form PCT/ISA/210 (continuation of Form PCT/ISA/200) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 94/09872

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
See Annex
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)



FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210

Remark : Although claims 1-45 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Remark : Although claim 46 is directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out on the alleged effects of the compound/composition.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US 94/09872

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0555880	18-08-93	AU-A- 3298893	19-08-93
		CA-A- 2089229	15-08-93
		JP-A- 6220096	09-08-94
WO-A-9308207	29-04-93	AU-A- 3122693	21-05-93
		CA-A- 2121798	29-04-93
		FI-A- 941837	30-05-94

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG  
, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG), AP(KE, MW, SD), AM, AT,  
AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, C  
Z, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU  
, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR,  
LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, N  
O, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI  
, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN

